

Національна академія наук України
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

ДЕКІНА СВІТЛАНА СЕРГІЇВНА



УДК 547.56:577.151.4:577.152.1

**БІОТЕХНОЛОГІЯ МУКОАДГЕЗИВНИХ ЛІЗОЦИМ-ПОЛІМЕРНИХ
СИСТЕМ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (м. Одеса)

Науковий консультант: доктор біологічних наук,
професор, завідувач лабораторії
фізико-хімічних основ біотехнології,
заступник директора з наукової роботи
РОМАНОВСЬКА Ірина Ігорівна,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор
КОВАЛЕНКО Валентина Миколаївна,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»,
завідувач відділу токсикології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
ПОЄДИНОК Наталія Леонідівна,
ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України»,
старший науковий співробітник

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
ГРИНЕНКО Тетяна Вікторівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник

Захист відбудеться «11» вересня 2020 р. о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» (03056, м. Київ, просп. Перемоги 37, корпус 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою 03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37.

Автоферат розіслано « » серпня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради Д 26.002.28,
д.т.н., с.н.с., доцент



Н.Б. Голуб

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На рубежі XX-XXI століть резистентність збудників бактеріальних захворювань до лікувальних препаратів призводить до різкого зниження ефективності етіотропної терапії інфекційних хвороб (Frieri M., 2017; Munita J.M., 2016; Yelin I., 2018). У травні 2015 р. Всесвітня асамблея охорони здоров'я затвердила Глобальний план дій щодо стійкості до протимікробних препаратів. Урядом України затверджено Національний план дій щодо боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів, до складу якого входить посилення наукових досліджень щодо антибіотикорезистентності (Розпорядження № 116-р від 6 березня 2019 р.). Тому пошук і створення нових антибактеріальних препаратів з використанням природних біологічно активних агентів є пріоритетним напрямом досліджень. До природних антибіотиків належить лізоцим (КФ 3.2.1.17) – гідролітичний ензим, що руйнує клітинну стінку бактерій за рахунок гідролізу β -1,4 -зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну в складі пептидоглікану і між залишками N-ацетил-D-глюкозаміну в складі хітодекстрину (Benkerroum N., 2008). Сучасні біотехнологічні методи створення нових іммобілізованих форм ензимів відкривають широкі можливості їх застосування в медицині, харчовій і фармацевтичній та інших галузях промисловості (Романовская И., 2012; Dwevedi A., 2016; Minter S., 2017).

У медицині застосовують розчини лізоциму при лікуванні хронічних септичних станів і гнійних процесів, при опіках, обмороженнях, кон'юнктивітах, ерозії рогівки ока, стоматиті та інших інфекційних захворюваннях. Відсутність нових ефективних лікарських форм лізоциму поряд з необхідністю заміни в можливих випадках антибіотиків визначає актуальність досліджень в сфері медичної біотехнології - іммобілізації з використанням мукоадгезивних полімерних матриць медичного призначення для отримання стабільних високоактивних лікарських форм (розчинів, гелів, нерозчинних гідрогелевих покриттів, плівкових форм і таблеток) пролонгованої дії для нанесення на слизову оболонку. Їх перевагами перед розчинами ензиму є точність дозування, підвищена біодоступність, стабільність, сайт-специфічне введення, тривалість дії, зручність застосування (Ahmad A., 2019; Jahadi M., 2017; Romanovskaya I., 2012; Singh M., 2017). Перспективне використання в таких дослідженнях лізоциму, виділеного економічним методом. Крім того, вкрай актуальним є вирішення проблеми розширення антимікробної дії лізоциму на грамнегативні бактерії і гриби поряд з підвищенням його гідролітичної активності (Cegielska-Radziejewska R., 2010; Leśniewski G., 2012; Ntzipani A., 2010).

Розробка полімерних форм іммобілізованого лізоциму представляє як теоретичний, так і практичний інтерес, доповнюючи знання в галузі біотехнології, біоорганічної, фармацевтичної хімії про властивості матриць, продуктів і характер взаємодії ензим-носіїв, фізико-хімічні і медико-

біологічні властивості та їх функціонування як потенційних лікарських засобів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт в лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України в період 2010-2019 рр. за наступними темами: «Мукоадгезивні полімерні системи пролонгованої антибактеріальної дії з іммобілізованим лізоцимом» (2012 - 2014 рр., № держ. реєстрації 0113U001342), «Розробка нових лізоцим-полімерних систем антимікробної і протизапальної дії - перспективних препаратів топічного способу введення» (2014- 2015 рр., № держ. реєстрації 0114U002201), «Фізико-хімічні основи створення комплексного антибактеріального препарату сублінгвального застосування» (2015-2016 рр., № держ. реєстрації 0115U002148) та «Біотехнологія створення комплексного антибактеріального препарату для сльозозамінної терапії» (2017-2018 рр., № держ. реєстрації 0117U003067).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи - теоретичне і експериментальне обґрунтування біотехнології отримання нових мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем для розробки ефективних стабільних ензимних препаратів антибактеріальної дії.

Відповідно до поставленої мети основними завданнями роботи були наступні:

1. Удосконалити спосіб виділення лізоциму з протеїну курячого яйця і встановити біохімічні та фізико-хімічні властивості отриманого ензиму (вивільнення білка, гідролітична активність, гомогенність, білково-фракційний склад, рН- і температурний оптимуми, строки зберігання).

2. Дослідити вплив іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність отриманого ензиму в умовах, наближених до фізіологічних, з подальшим прогнозуванням активності лізоциму методом QSAR аналізу.

3. Встановити наявність взаємодії лізоциму з розчинами полімерів природного і синтетичного походження; розробити хімічні і фізичні способи іммобілізації лізоциму з використанням полімерів або комплексних полімерних матриць, що дозволять отримувати різні форми іммобілізованих препаратів: розчини, гелі, плівки, таблетки пролонгованої антибактеріальної дії.

4. Визначити ефективність іммобілізації (вміст білка і збереження гідролітичної активності отриманих препаратів лізоциму), дослідити фізико-хімічні властивості іммобілізованих препаратів (рН- і термозалежності, рН- і термостабільності гідролітичної активності, біокінетика і ін.).

5. Здійснити медико-біологічну перевірку отриманих іммобілізованих форм лізоциму.

Об'єкт дослідження - біотехнологія іммобілізації лізоциму з білка курячого яйця на полімерних носіях.

Предмет дослідження - фізико-хімічні, біохімічні та біологічні властивості вільного і іммобілізованого в полімерні носії лізоциму білка курячого яйця.

Методи дослідження – комплекс біохімічних, фізико-хімічних методів (УФ-спектроскопія, люмінесцентний аналіз, мас-спектрометрія MALDI, електрофорез в ПААГ, віскозиметрія) - для дослідження функціонування вільного і іммобілізованого ензиму; морфологічних (скануюча електронна мікроскопія) - для оцінки якості препаратів і їх ефективності в біологічних дослідженнях; методів регресійного аналізу, часткових найменших квадратів (PLS) - для побудови залежності структура - властивість / реакційна здатність (QSAR/QSPR); технологічних - для розробки біотехнології отримання, документації різних форм іммобілізованого лізоциму.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено наукові основи біотехнології конструювання мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем шляхом регулювання складу, активності, стабільності і пролонгування їх комплексів з природними і синтетичними полімерними матрицями за рахунок іонних, водневих і міжмолекулярних нековалентних взаємодій. Вперше запропонована концепція поведінки макромолекул лізоциму в розчинах полімерів при їх іммобілізації різними методами.

Встановлено гомогенність, білково-фракційний склад і активність лізоциму протеїну курячого яйця, виділеного за модифікованим методом В.Я. Мікельсона.

Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель з використанням ентропії, ентальпії іонів металів, а також електронегативності за Полінгом як дескрипторів, що описує інгібуючий вплив широкого набору іонів металів на гідролітичну активність лізоциму.

Визначені підходи до стабілізації та пролонгування гідролітичної дії лізоциму, в тому числі на слизових оболонках, шляхом використання полімерів різної мукоадгезивної сили (натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, желатин, полівініловий спирт та ін.)

Розроблені біотехнології іммобілізації лізоциму хімічними і фізичними методами з використанням природних і синтетичних носіїв, що дозволяють отримувати різні форми ензиму з високою гідролітичною активністю, тривалого строку зберігання.

Встановлено антимікробну, протизапальну дію мукоадгезивних очних крапель, гелів, кріогелю, плівок і таблеток з іммобілізованим лізоцимом в мікробіологічних випробуваннях *in vitro*, а також на моделях травматичного кератиту, стоматиту і гінгівіту. Зміна кінетичних параметрів функціонування лізоциму після іммобілізації свідчить про вплив полімерів (желатину в меншій мірі, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту), що проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і відношення $K_M/V_{\text{макс}}$, що пояснюється перехідною активацією ферменту.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано модифікацію методу виділення лізоциму з білка курячого яйця, що дозволяє отримувати в кристалічному вигляді в лабораторних умовах стабільний активний ензим, що відрізняється високим ступенем чистоти, перспективний для використання в біотехнологічних і біомедичних цілях.

Отримана методом QSAR аналізу трьохпараметрова модель, що включає наступні дескриптори: електронегативність за Полінгом, ентропію і ентальпію іонів металів (лужних, лужноземельних і перехідних), дозволяє прогнозувати з високим ступенем вірогідності гідролітичну активність лізоциму в присутності іонів металів у водному розчині.

Розроблено ефективні біотехнологічні способи хімічної і фізичної стабілізації та іммобілізації лізоциму з використанням полімерів природного і синтетичного походження. Отримано мукоадгезивні очні краплі на основі декстрану та гідроксипропілметилцелюлози, що відповідають вимогам Державної Фармакопеї України; гелі на основі натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з кверцетином, гідрогелеві покриття на основі кріогелю полівінілового спирту, полімерні плівки на основі желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і таблеткові суміші. Отримані перспективні для застосування в офтальмології та стоматології як лікувально-профілактичні засоби біотехнологічні продукти з лізоцимом, іммобілізованим в різні полімерні матриці, що характеризуються високими рівнями вмісту білку і гідролітичної активності, пролонгованою дією, тривалим терміном зберігання. Іммобілізовані в желатин лізоцим і кверцетин (діючі речовини) входять до складу біологічно-активної добавки «Лізоцим-ФОРТЕ», впровадженої на НВА «Одеська біотехнологія» і ТОВ «Біотех» (Технічні умови України (ТУ У) 10.8-27420386-004: 2016).

Особистий внесок автора полягає в плануванні та підготовці дисертаційної роботи. Автором самостійно обґрунтовані тема і концепція дисертаційної роботи, проведено пошук і аналіз літератури, постановка задач, розроблені схема і методологія експериментальних досліджень, проведено статистичний аналіз і інтерпретацію отриманих результатів, підготовлені до друку публікації за темою роботи.

Викладені в дисертації результати експериментальних досліджень отримані при безпосередній участі автора або під його керівництвом. Співвиконавці проведених досліджень наводяться в співавторах відповідних наукових публікацій.

Формулювання теми, основних положень і висновків проведені спільно з науковим консультантом професором, д.б.н. Іриною Ігорівною Романовською. У розробці методів іммобілізації лізоциму, дослідженні фізико-хімічних, біохімічних і кінетичних особливостей функціонування отриманих препаратів брали безпосередню участь інж. Овсепян А.М., с.н.с., к.х.н. Севастьянов О.В. (співробітники лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, де працює здобувач). Електрофоретичні

дослідження проведені на кафедрі генетики біологічного факультету ОНУ імені І.І. Мечникова спільно з к.б.н., доц. Топтіковим В.А.

Медико-біологічні та мікробіологічні дослідження іммобілізованих препаратів лізоциму проведені в ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» спільно з зав. лаб. фармакології і тканинної терапії, д.м.н., проф. Сотніковою О.П., зав. лаб. мікробіології Молодою А.Л., в ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» спільно з чл.-кор. УААН, д.б.н., проф. Левицьким А.П., в НТІЦ «Водообробка» спільно з Псахіс Б.Й., Псахіс І.Б.

QSAR аналіз впливу іонів металів на гідролітичну активність лізоциму проведено спільно з зав. відділом молекулярної структури і хемоінформатики, чл.-кор. НАН України, д.х.н., проф. Кузьмінім В.Є і с.н.с., к.х.н. Артеменко А.Г. Мас-спектрометричні дослідження проведені в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України спільно з к.х.н., с.н.с. Громовим Т.Ю. Результати скануючої електронної мікроскопії отримані і інтерпретовані за участю д.ф.-м.н., проф. Ткача В.Ф. в Інституті надтвердих матеріалів імені В.М. Бакуля НАН України.

Особистий внесок автора підтверджується представленими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, доповідалися і обговорювалися на засіданні Вченої ради Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (2018 г.), а також були представлені на міжнародних і українських наукових конференціях і симпозіумах, серед яких XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 9-13 апреля 2012 г.); XIV Конференція молодих учених та студентів-хіміків Південного регіону України (Одеса, 25-27 квітня 2012); Науково-практична конференція «Сучасні проблеми фармакології, косметології і аромології» (20 вересня 2013, Одеса); XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва); XVI Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28-30 апреля 2014, Одесса); XI Украинский биохимический конгресс (Киев, 6-10 октября 2014); IV Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, 16-17 жовтня 2014); конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015); XVII Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28 апреля – 1 мая 2015, Одесса); International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (Odesa, 1-4 June, 2015); Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016» (Київ, 26-27 травня 2016); Науково-практична конференція офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса); XVIII Наукова молодіжна конференція

«Проблеми та досягнення сучасної хімії» (17-20 травня, Одеса); VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016); XIX Наукова молодіжна конференція «Проблеми і досягнення сучасної хімії» (26-28 квітня 2017, Одеса); International conference on biomaterials and biosensors "4th BIOMATSEN 2019" (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 42 наукові праці, у тому числі 1 монографія, 19 статей у наукових фахових виданнях (з них 4 статті у виданнях іноземних держав, 15 у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 роботи в інших виданнях), 1 патент на винахід, 3 патенти на корисну модель, 16 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури (розділ 1), матеріалів і методів експерименту (розділ 2), результатів, їх обговорення (розділи 3, 4, 5, 6), висновків, списку цитованої літератури (257 джерел) і 4 додатків. Робота викладена на 265 сторінках комп'ютерного тексту, містить 75 таблиць і 99 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, представлено загальну характеристику роботи, сформульовані мета і завдання досліджень, наукова новизна і практичне значення отриманих результатів.

У **першому розділі** «Імобілізація лізоциму на полімерних носіях, використання отриманих препаратів в медицині (огляд літератури)» наведені дані літератури стосовно гідролітичного ензиму лізоциму, його походження, молекулярна структура, механізм дії, фізичні та хімічні властивості, висвітлено застосування в медицині як антимікробного агента. Проаналізовані біотехнологічні підходи до створення іммобілізованих у полімери природного і синтетичного походження форм ензиму. Розглянуті наявні проблеми, пов'язані з розробкою іммобілізованого лізоциму, особливості використання полімерних матриць для створення мукоадгезивних форм. Огляд наукових публікацій з іммобілізації лізоциму свідчить, що методи фізичної або хімічної іммобілізації досліджуються рівною мірою, і залежать від передбачуваної області застосування іммобілізованого ензиму (Bayazidi P., 2018, Kiristi M., 2015; Ронжин Н., 2016). Показана актуальність розробки нових біотехнологічних препаратів ензиму з мукоадгезивними властивостями, антимікробної дії, у формі очних крапель, гелей, гідрогелевих покриттів, плівок і таблеток, перспективних для використання в медицині.

У **другому розділі** «Матеріали і методи дослідження» наведені методики проведення експериментальних і теоретичних досліджень за темою дисертації. У роботі використовували лізоцим білка курячого яйця (ЛІЗ) («AppliChem», «Sigma-Aldrich»), лужну протеазу *Bacillus subtilis*, протеазу *Cremonium chrysogenum* (ДП «Ензим»), полівініловий спирт (ПВС),

декстран, желатин, гідроксипропілметилцелюлозу, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози («Sigma-Aldrich»).

Білок визначали методами Лоурі-Хартрі (Hartree E.F., 1972), Брадфорда (Bradford M., 1976), прямої спектрофотометрії (Дарбре А., 1989). Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом в натрій-фосфатному буферному розчині (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , pH 6.2, 0,1 моль/дм³), субстрат *Micrococcus lysodeikticus* (Shugar D., 1952), За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка приводила до зменшення оптичної густини суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* на 0,001 одиниці за 1 хв. Кверцетин визначали згідно (Ogura J., 1968), біглюконат хлоргексидину (Aoki H., 1966).

Виділення лізоциму з білка курячого яйця здійснювали за модифікованим нами методом (Микельсон В.Я., 1984), гель-хроматографію на Sephadex G-50 згідно (Кочетов Г.А., 1980). Електрофорез білкових препаратів проводили в 15 % ПААГ згідно (Духин С.С., 1976). Молекулярні маси досліджуваних білків розраховували за калібрувальною кривою «відносна електрофоретична рухливість/Ig молекулярної маси (кДа)», маркерні білки: цитохром с (13 кДа), лізоцим (14,4 кДа), міоглобін (18 кДа), овальбумін (40 кДа), бичачий сироватковий альбумін (67 кДа).

Вплив іонів металів вивчали, визначаючи гідролітичну активність лізоциму після сумісної інкубації через 10, 15, 30, 60 і 120 хв в 0,1 моль/дм³ буферному розчині імідазол-НCl (pH 6,2, 55 °C). Концентрація хлоридів металів (Li; Na; K; Cs; Mn (II); Fe (II); Co; Cu; Mg; Ca) становила 5 ммоль/дм³. Для пошуку зв'язку «структура-властивість» використовували метод множинної лінійної регресії (Ферстер Э., 1983, Андронаті С.А., 2012). Як дескриптори, що описують властивості іонів металів, аналізували близько 70 характеристик (Волков А.И., 2005). Мас-спектрометричні вимірювання взаємодії лізоциму з полімерами методом матрично активованої лазерної десорбції/іонізації виконували на приладі Autoflex II («Bruker Daltonics», ФРН) відповідно (Binkley S., 2010).

Краплі «штучна сльоза» з лізоцимом готували наступним чином: змішували розчини 0,39% гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 0,1% лізоциму і 0,1% декстрану 60 (розчинник 0,9% NaCl) у відношенні 2: 1: 1, відповідно. Отримані краплі піддавали стерилізуючій фільтрації і зберігали при температурі 0-4 °C.

Імобілізацію лізоциму у натрієву сіль карбоксиметилцелюлози проводили, попередньо готуючи гель полімеру, до якого вносили розчин лізоциму (50 мг в 5 см³, кінцева концентрація ензиму в гелі 0,5%) і доводили до кінцевої концентрації Na-КМЦ 3%, зберігали при температурі 4 °C.

Імобілізація лізоцима в гель желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози полягала в наступному: до 9 см³ 10% водного розчину желатину додавали 1 см³ водного розчину лізоциму в концентрації 0,5% від желатину, додавали 1 см³ гліцерину і 1 см³ водного розчину Na-КМЦ в концентрації 0,5% від желатину, перемішували. Отриману суміш

виливали на підкладку, висушували при 20 °С. Після висушування висікали плівки діаметром 6 мм, обробляли 0,05% розчином біглюконату хлоргексидину, пакували і зберігали при 4 °С.

Для проведення кріоіммобілізації лізоциму до 25 см³ 10% водного розчину ПВС додавали 8,8 см³ 0,1% водного розчину ензиму. Суміш вносили в скляні чашки Петрі площею 63,6 см², піддавали декільком циклам заморожування (-24 °С) – розморожування (4 °С), згідно (Лозинский В.И., 1998). Отримували пружний кріогель з іммобілізованим лізоцимом.

Таблетовані суміші з іммобілізованим лізоцимом отримували вологим гранулюванням згідно Державної фармакопеї України (ДФУ, 2011).

Вимірювання в'язкості проводили віскозиметром Оствальда за (Бартеньев Г.М., Френкель С.Я., 1990). Визначення мукоадгезії іммобілізованих препаратів проводили згідно (Kharenko E., 2008). Морфологію поверхні обраних форм іммобілізованих препаратів лізоциму досліджували методом скануючої електронної мікроскопії (SEM). Зразки SEM покривали напилюванням Au/Pd з використанням електронно-променевого випарника Edwards Auto 306 і досліджували за допомогою скануючого електронного мікроскопа (Zeiss EVO 50XVP) при використанні 10 кВ.

Динаміку виходу лізоциму і БАР з іммобілізованих препаратів досліджували, визначаючи їх кількість у водному розчині. Залежність активності лізоциму від рН і температури реакційного середовища визначали у буферних розчинах (рН 3,0-10,0), при температурі 20 - 80 °С, відповідно. рН-стабільність і термостабільність ензиму визначали при рН 5,5 і 80 °С, відповідно, протягом 180 хв. Розчини або отримані іммобілізовані препарати лізоциму зберігали при 4 °С, визначаючи гідролітичну активність ензиму з необхідним інтервалом (день, тиждень, місяць). Кінетику гідролізу субстрату вільним і іммобілізованим лізоцимом досліджували за початковими швидкостями з лінеаризацією даних у координатах Хейнса, Лайнуївера-Берка, розрахунковим методом (Корниш-Боуден Э., 1979).

Визначення активності еластази, уреазі і концентрації малонового діальдегіду здійснювали згідно (Левицкий А.П., 2007). Чутливість мікроорганізмів до діючих компонентів таблетованих сумішей визначали за (Некрасова Л. С., 2007). Використовували музейні штами *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* колекції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Антимікробну активність іммобілізованого лізоциму визначали методом дифузії в агар (ДФУ, 2011) на стандартному живильному середовищі АГВ і характеризували зоною затримки росту мікроорганізмів при навантаженні мікробної флори $1,5 \cdot 10^8$ КУО/см³. Дослідження офтальмонешкідливості, протизапальних і регенераторних властивостей очних крапель проводили згідно (Чайка Л.А., 2003). Лікувально-профілактичну дію мукоадгезивних препаратів лізоциму (гелю, плівок, таблеткових сумішей) досліджували при запаленнях слизової оболонки порожнини рота щурів лінії Вістар, що викликали індометацином,

ліпополісахаридом, бджолою отрутою. Як референс-препарат в експериментах з таблетованими сумішами використовували таблетки «Лізак» (АТ «Фармак»). Експерименти з тваринами здійснювали згідно Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» з використанням епібульбарної анестезії і тіопенталового наркозу.

Експериментальні дані оброблені методами варіаційної статистики. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень при кількості повторень $n=5$. Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$) Коефіцієнти лінійної кореляції перевищували 99 %, для QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) - дослідження 96 %.

У **третьому розділі** «Розробка методу виділення і дослідження властивостей лізоциму з білка курячих яєць» нами запропоновано модифікацію способу виділення лізоциму (Микельсон В.Я., 1984), схема якого представлена на рис. 1.

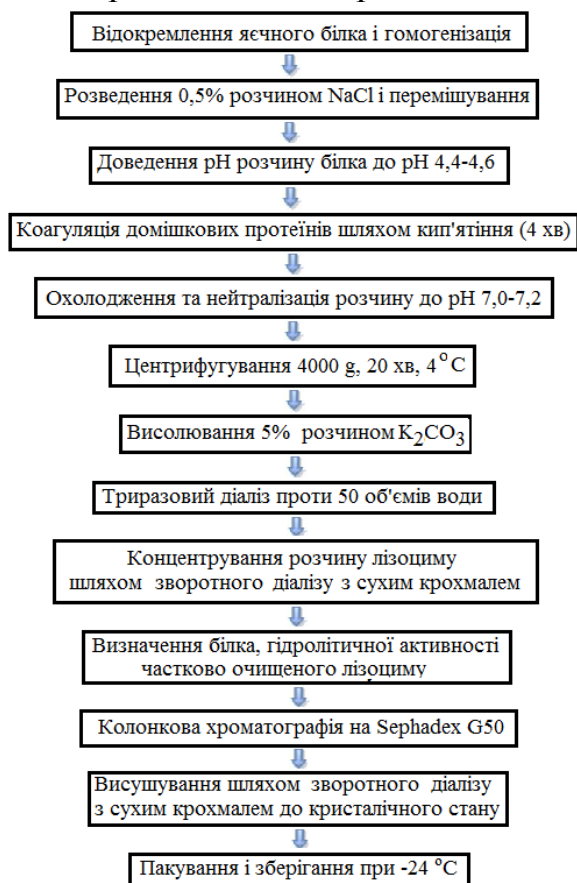


Рис. 1 Схема виділення лізоциму з білка курячого яйця

Модифікація методу полягає в наступному:

- п'ятикратне розведення білка (замість 30-кратного) з подальшим висолюванням неденатурованих протеїнів 5% розчином карбонату калію;
- введення додаткових трьох стадій діалізу для видалення низькомолекулярних домішок;
- проведення стадії зворотного діалізу з сухим крохмалем з метою отримання ензиму в кристалічному вигляді.

MALDI-спектр очищеного ензиму показав наявність одного піку зі значенням m/z близько 14181 (рис. 2), що відповідає еталонному лізоциму AppliChem. Згідно з результатами SDS-електрофорезу найбільш інтенсивна смуга знаходиться в діапазоні М.м. від 12 до 17 кДа і чистота виділеного лізоциму становить 95-98% (рис. 3).

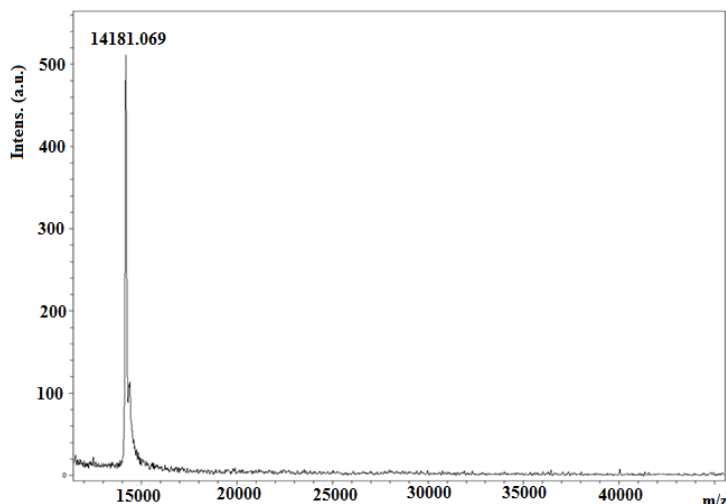


Рис. 2. MALDI-спектр виділеного очищеного лізоциму

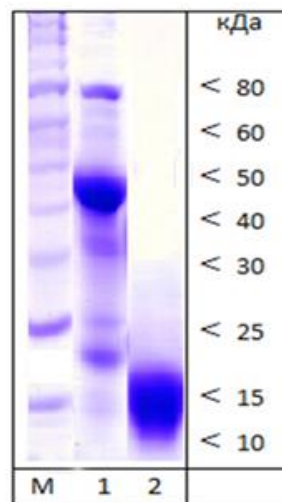


Рис. 3. SDS-електрофорез лізоциму. М – маркери; 1 - цілісний протеїн курячого яйця, 2 - лізоцим

В результаті виділення і очищення лізоциму отримані безбарвні прозорі пластинчасті кристали ензиму (рис. 4).

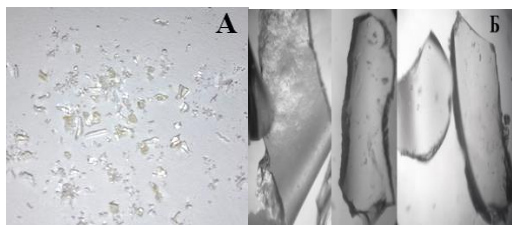


Рис. 4. Мікрофотографії виділеного лізоциму (збільшення А×8, Б×120)

Дослідження фізико-хімічних властивостей комерційного і виділеного лізоциму свідчить про збіг рН і термооптимумів гідролітичної активності і питомої активності виділеного ензиму. Отриманий продукт зберігає гідролітичну активність протягом 9 міс. при температурі -24 °С (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика комерційного і виділеного лізоциму

Показник	Лізоцим*	
	«AppliChem»	виділений
Активність*, од/мг, $M \pm m$	20000 ± 5000	22025 ± 1500
рН-оптимум	6,0	6,0
Термооптимум, °С	55 °С	55 °С
Константи термоінактивації при 80 °С*, $хв^{-1}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$4,7 \cdot 10^{-3}$
Строки зберігання ензиму при -24 °С, міс	24	9

* – $P < 0,05$ при $n=5$

Модифікацією методу В.Я. Мікельсона отримано лізоцим з протеїну курячого яйця з виходом 3,2% від загального білка і активністю 22025 ± 1500 од/мг, що порівнюється з активністю комерційного препарату «AppliChem». Методами мас-спектрометрії і SDS-електрофорезу в 10% ПААГ підтверджено чистоту виділеного ензиму ($\sim 95-98\%$). Метод виділення є економічним і доступним для реалізації в лабораторних умовах, перспективний для використання в біотехнології.

Дослідження впливу іонів лужних, лужноземельних і перехідних металів на гідролітичну активність лізоциму. Незважаючи на високу стабільність, ензим втрачає активність в присутності іонів металів (Freyhult E., 2003, Hughes A., 2012). Оцінити внесок їх фізико-хімічних параметрів спробували вперше за допомогою QSAR аналізу. Найнижча гідролітична активність спостерігається при взаємодії лізоциму з катіонами лантану La^{3+} (33,0%), алюмінію Al^{3+} (14,3%), заліза Fe^{2+} (37,8%) і літію Li^{+} (34,8%) (рис. 5). Пригнічення активності ензиму у випадку з залізом можливо відбувається через зміну валентності катіона з Fe^{2+} на Fe^{3+} , а Li^{+} належить до токсичних біологічно активних катіонів й утворює з лізоцимом міцний комплекс, істотно змінюючи конформацію білкової молекули (Коршун М.Н., 2011).

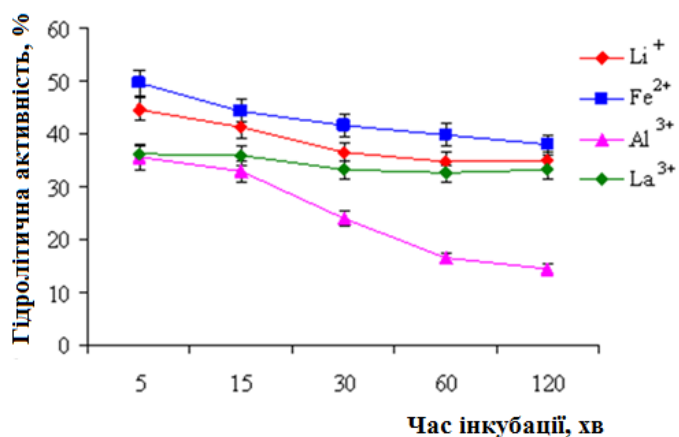


Рис. 5. Залежність гідролітичної активності лізоциму в присутності катіонів La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^{+} від часу інкубації в 0,1 М буферному розчині імідазол- HCl (рН 6,2, 55 °С)

Для кількісної оцінки впливу іонів металів на каталітичну активність лізоциму вся вибірка була розділена на дві групи: навчальну (13 іонів) і тестову (3 іона). У тестову вибірку були віднесені випадкові іони металів з різних груп (Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+}). В результаті була отримана адекватна 3-х параметрична QSPR модель, що описує гідролітичну активність лізоциму (A,%) в присутності хлоридів металів:

$$A = -173 + 0,52 S^{\circ} + 151 \text{EN} - 0,22 \Delta fH^{\circ},$$

де EN – електронегативність за Полінгом; S° , ΔfH° – ентальпія і ентальпія іонів металів у водному розчині. Три параметри в рівній мірі впливають на зміну гідролітичної активності. Статистичні характеристики моделі: коефіцієнт кореляції $R=0,89$; середньоквадратична помилка прогнозування $SE=9,2$; критерій Фішера $F=12,56$, що перевищує критичне значення ($F_{\text{кр}}=7,49$) для рівня значущості 0,99. Модель також є стійкою (коефіцієнт кореляції в умовах змінного контролю $Q^2 = 0,66$), має хорошу здатність прогнозування ($R^2_{\text{test}} = 0,96$).

Співвідношення спостережуваних і прогнозованих значень активності лізоциму для навчальної та тестової вибірок представлені на рис. 6.



Рис. 6.
Спостережувані (■) і
прогнозовані (○)
значення
гідролітичної
активності лізоциму

У четвертому розділі «Розробка мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем антибактеріальної та протизапальної дії» досліджено взаємодію ензиму з полімерами, розроблені методи іммобілізації лізоциму у мукоадгезивні матриці й технологічні схеми отримання різних форм ензиму; вивчені фізико-хімічні та медико-біологічні особливості їх функціонування.

Для отримання стабільних форм білкових препаратів в біотехнології, в залежності від призначення, застосовують 2 основні підходи: іммобілізація шляхом нековалентного зв'язування і хімічне приєднання безпосередньо до носія або за допомогою лінкера (Spahn C., 2008; Guisan J., 2006). Для іммобілізації лізоциму в роботі використовували методи включення в гелі полімерів, що меншою мірою порушують білкову структуру ензиму і дозволяють конструювати нові стабільні, високоактивні препарати пролонгованої дії, визначеного вектора всмоктування.

Дослідження взаємодії лізоциму з розчинами полімерів природного і синтетичного походження. З метою стабілізації і пролонгування дії ензимів використовуються полімери природного і синтетичного походження. У кожному конкретному випадку необхідно проведення комплексу досліджень для з'ясування наявності можливих взаємодій білкової молекули і полімеру, що можуть призводити до втрати біологічної активності ензиму. У разі взаємодії ферменту і полімерів в водних розчинах дослідження доцільно проводити з використанням реологічних і оптичних методів. Це обумовлено багатоточковими і численними нековалентними взаємодіями компонентів, відсутніми в твердому стані.

Спостережувані зміни значень в'язкості розчинів таких полімерів як декстран (36,6%), натрієва сіль карбоксиметилцелюлози (22,30%), желатин (45,50), гідроксипропілметилцелюлоза (24,50%) при додаванні лізоциму можуть свідчити про утворення асоціатів лізоцим-полімер. Взаємодія декстрану і Na-КМЦ з лізоцимом підтверджується і зміною УФ-спектрів поглинання і спектрів люмінесценції (рис. 7). У розчині лізоцим-Na-КМЦ спостерігається гіперхромний ефект (рис. 7А) з підвищенням концентрації полімеру, ймовірно, за рахунок виникаючих електростатичних взаємодій. У спектрах люмінесценції (рис. 7Б) спостерігається зменшення інтенсивності

люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) ензиму при збільшенні концентрації полімеру, що також свідчить про утворення білок-полімерного комплексу.

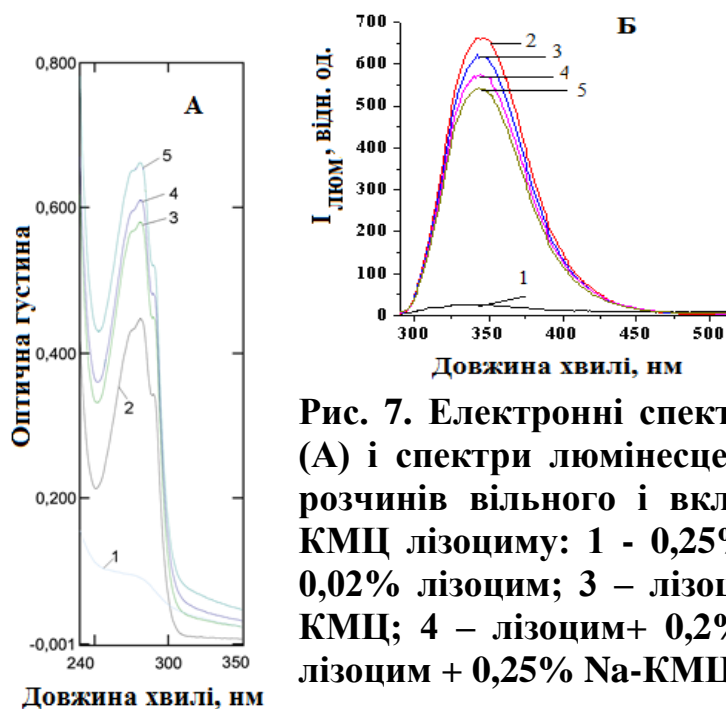


Рис. 7. Електронні спектри поглинання (А) і спектри люмінесценції (Б) водних розчинів вільного і включеного в Na-КМЦ лізоциму: 1 - 0,25% Na-КМЦ; 2 - 0,02% лізоцим; 3 – лізоцим + 0,1% Na-КМЦ; 4 – лізоцим+ 0,2% Na-КМЦ; 5 - лізоцим + 0,25% Na-КМЦ

З даних літератури відомо, що у водних розчинах лізоцим утворює олігомерні структури за рахунок нековалентних взаємодій (ван-дер-ваальсові, електростатичні, гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки та ін.), беручи участь в молекулярних механізмах агрегатоутворення (Dai G., 2004; Artemova N., 2008). Методом МАЛДІ підтверджено наявність таких асоціатів в комерційному препараті лізоциму в водному розчині, молекула ензиму представлена як мономером з М.м. 14,225 кДа, так і олігомерними формами - від димеру з М.м. 28,527 кДа до октамеру з М.м. 114,845 кДа.

Вперше показано, що в процесі іммобілізації лізоциму в желатин і Na-КМЦ при збільшенні масового відношення ензим: носій спостерігається розпад олігомерних асоціатів на мономери (табл.2).

Таблиця 2

Відношення інтенсивностей піків структур лізоциму, що утворюються в водних розчинах полімерів

Масові відношення ензим: полімер	Мономер/ Димер	Мономер/ Тример	Мономер/ Тетрамер
Лізоцим	5,6	15,2	41,8
Лізоцим: желатин (1: 50)	17,3	111,6	412,3
Лізоцим: желатин (1: 150)	62,7	-	-
Лізоцим: желатин (1: 600)	-	-	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 50)	15,8	66,7	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 150)	17,7	-	-
Лізоцим: Na-КМЦ (1: 600)	47,7	-	-

Отже, збільшення концентрації полімеру в розчині приводить до збільшення відношення інтенсивності піків мономера лізоциму до димеру і тримеру. При цьому менше число олігомерних структур лізоциму в разі Na-КМЦ можна пояснити міцнішими, ніж з желатином, взаємодіями, що може сприяти збільшенню пролонгування біологічної дії ензиму в подальшій розробці його мукоадгезивних лікарських форм.

Таким чином, з використанням комплексу фізико-хімічних методів показано, що стабілізація лізоциму розчинами полімерів відбувається за рахунок утворення асоціатів і залежить від природи, структури і концентрації полімерних носіїв. Отримані результати відносяться до молекулярних механізмів дезагрегації асоціатів лізоциму і індуються процесом іммобілізації в досліджувані полімери за рахунок комплексоутворення, в подальшому використанні при розробці ефективних мукоадгезивних препаратів ензиму пролонгованої дії, відповідно до поставлених біотехнологічних завдань.

Розробка препарату «штучна слеза» з лізоцимом. Суттєвою проблемою сучасної офтальмології є синдром «сухого ока» (ССО) (Придачина Д.В., 2011). При цьому стані кількості слізної плівки на рогівці недостатньо для зволоження поверхні ока, в результаті чого виникає дискомфорт, а в тяжких випадках - втрата зору. Одним з основних методів лікування синдрому є слъозозамінна терапія (Bron A., 2015). Лізоцим є одним з найбільш важливих бактерицидних компонентів слізної рідини, тому додавання ензиму до препаратів слъозозамінної терапії є вкрай актуальним. Використання полімерів, що мають мукоімімічні властивості, дозволяє моделювати муциновий шар передрогівкової слізної плівки, попереджуючи або нівелюючи дефіцит вологи в кон'юнктивальній порожнині, і відкриває перспективи створення цілого ряду нових препаратів на полімерній основі з різним компонентним складом для терапії широкого спектра очних захворювань різної етіології. З огляду на раніше проведені дослідження щодо взаємодії лізоциму з полімерами і патогенетичну доцільність застосування полісахаридних носіїв для отримання препаратів слъозозамінної терапії, ми використовували декстран і гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ). Препарат «Искусственная слеза» з таким складом полімерів випускається РУП «Белмедпрепараты». Кількість лізоциму для включення в розчини полімерів обирали відповідно до його вмісту в нормі в слъозі людини ($0,81 \pm 0,31 - 1,68 \pm 0,66$ мг/см³) (McDermott A., 2013), характеристика крапель представлена у табл. 2.

Густина, осмоляльність, в'язкість розроблених крапель відповідають характеристикам слъози людини. Дослідження рН-профілю гідролітичної активності стабілізованого полімерами лізоциму показало зміщення рН-оптимуму на 1 од в область нейтральних значень, що сприятиме більшій ефективності крапель, оскільки рН слъози людини при ССО знаходиться в діапазоні значень рН 6,75-7,75 (Asenjo J., 2011). Гідролітична активність при температурі 37 °С на 30 % перевищує активність вільного ензиму. Краплі з

лізоцимом піддавали стерилізуючій фільтрації зі збереженням 89,3% активності від вихідної активності. Як консервант використовували бензалконію хлорид, що має високу бактерицидну активність і широкий спектр дії стосовно стафілококів, стрептококів, грамнегативних бактерій (кишкової і синьогнійної паличок, клебсієли і ін.), анаеробних бактерій, чинить протигрибкову, антипротозойну дію (Ash M., 2004).

Таблиця 2

Характеристика очних крапель з лізоцимом

Показник	Результат, $M \pm m^*$
Масове відношення ГПМЦ:декстран	3,9:1
Вміст лізоциму, мг/см ³	1,00±0,05
Гідролітична активність, од/см ^{3**}	38200±2000
Органолептичні властивості	Прозорі, безбарвні, без запаху, липкі
pH	7,4
Густина, г/см ³	0,996 ± 0,003
Осмоляльність, мосмоль/дм ³	298 ± 2
Показник заломлення	1,3339
Час збегігання, міс	12

* $n=5$, $P<0.05$; **активність- 98,5 % при 37°C; $A_{\text{макс}} = 40000$ од/мг

Вивчення офтальмонешкідливості і фармакотерапевтичної ефективності очних крапель «штучна сльоза з лізоцимом» на моделі травматичного кератиту експериментальних тварин показало відсутність алергізуючої дії і ефективну протизапальну і регенераційну дії, що прискорили ліквідацію запалення і процесу епітелізації порівняно з контролем у 1,5 рази.

Розробка мукоадгезивного гелю натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з іммобілізованим лізоцимом, лізоцимом і кверцетином. Іммобілізацію ензиму в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози здійснювали для отримання мукоадгезивних стоматологічних гелів при різних масових співвідношеннях лізоцим: полімер. Основні характеристики гелю наведені в табл. 3.

Таблиця 3

Характеристики мукоадгезивного гелю з іммобілізованим лізоцимом

Показник	Результат визначення
Гідролітична активність, од / мг	68200±3410 (* $P < 0,005$, ** $P > 0,05$)
Вміст лізоциму, мг / г гелю	2,0±0,1 (* $P < 0,001$)
Вміст води, %	95±5,6 (* $P < 0,005$)
pH	7,0±0,1
Органолептичні показники	однорідний, гомогенний, зберігає форму, пружний, пластичний

* - достовірність відмінностей між серіями експериментів для $n = 5$;

** - відносно початкової активності вільного лізоциму (68 000 од/ мг ензиму)

Імобілізація ензиму відбувається за рахунок іонних взаємодій негативно заряджених карбоксильних груп натрієвої солі карбоксиметилцелюлози з аміногрупами ензиму при масових відношеннях 1:4 - 1:10, тоді як зменшення кількості Na-КМЦ призводить до неповного включення.

На рис. 8 продемонстровано пролонгований кількісний вихід ензиму з мукоадгезивного гелю. Максимальна активність іммобілізованого препарату досягається після 180 хв інкубації в умовах, наближених до фізіологічних.

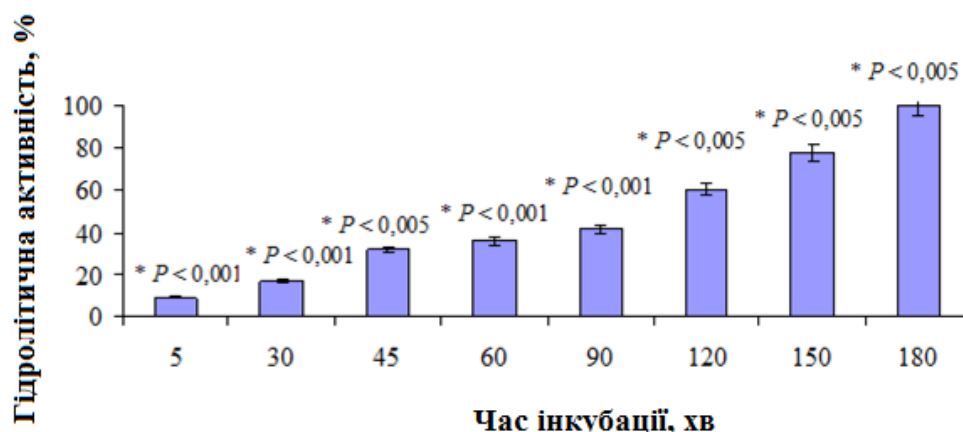


Рис. 8. Залежність гідролітичної активності лізоциму, іммобілізованого в гель Na-КМЦ, від часу його інкубації (фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 0,1 моль/дм³; $t = 37^{\circ}\text{C}$).

При вивченні температурної залежності зазначено звуження термопрофілю активності ензиму в діапазоні 60 - 80 °C, що може бути результатом часткової деструкції Na-КМЦ в умовах високих температур і призводити до дестабілізації білкової молекули. рН-профіль іммобілізованого лізоциму, навпаки, розширено в область кислих значень, так при рН 5,5 активність іммобілізованого ензиму на 42,4% вище, ніж вільного (рис. 9). рН-стабільність є одним з найважливіших параметрів, що контролюється при розробці лікарського препарату антибактеріальної і протизапальної дії (Кузин М.И., 1990; Чуєнко А.В., 1990). Вільний лізоцим стабільний в фізіологічних умовах при рН 6,0-7,4, однак зниження в область кислих значень призводить до часткової втрати активності (рис. 10).

Імобілізація в Na-КМЦ сприяє підвищенню активності в умовах слабокислого середовища і збереження її на високому рівні (95-100%) протягом 3 год, як при температурі 25 °C, так і при 37 °C.

Посилення терапевтичної ефективності розробленого гелю з лізоцимом можливо шляхом додавання природного поліфенолу - кверцетину, що має високу терапевтичну активність, унікальні протизапальну, капіляротекторну, антиоксидантну дії (Russo M., 2012; Formica J., 1995; Wang X., 2016).

Для рівномірного включення кверцетин в гель Na-КМЦ вводили у 50% спиртовому розчині, виходячи з рекомендованого дозування (Машковський М.Д., 2008). Дослідження масових відношень лізоцим: кверцетин: Na-КМЦ

показало, що при обраному відношенні (1: 0,4: 6) спостерігається рівномірний розподіл кверцетину, повне включення лізоциму з утворенням гелю. До складу також додавали спиртовий екстракт м'яти перцевої, гліцерин і хлоргексидину біглюконат.

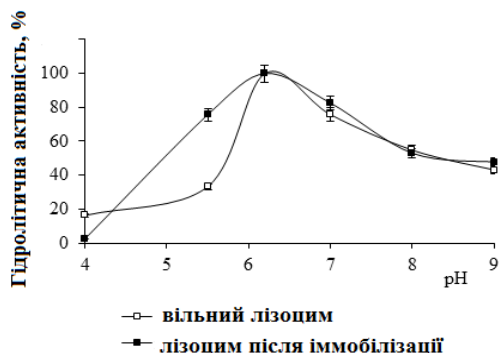


Рис. 9. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від pH інкубаційного середовища ($t = 55^{\circ}\text{C}$)

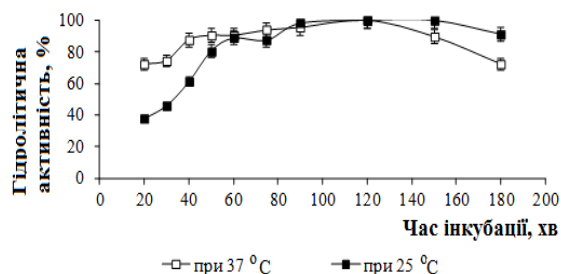


Рис. 10. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації (цитратно-фосфатний буферний розчин, pH 5,5, $t = 25^{\circ}\text{C}$; 37°C)

Гідролітична активність препарату склала 60100 ± 3000 од/мг ензиму, що становить 88% від активності внесеного ензиму (5 мг/г). Спостерігаємо зниження активності лізоциму пов'язано з присутністю етанолу в складі композиції. Кверцетин (2 мг/г гелю) перебуває у вигляді аморфної твердої дисперсії. Показано збереження динаміки виходу лізоциму в умовах, наближених до фізіологічних, кверцетин вивільняється за більш короткий час (75 хв).

Основні фізико-хімічні характеристики іммобілізованого сумісно з кверцетином лізоциму (pH-, термопрофіль активності, pH-, термостабільність) не відрізняються від таких гелю без кверцетину і зберігаються протягом року в умовах низьких температур.

Визначення адгезії до слизових оболонок проводили *in vitro*, використовуючи слизову оболонку тонкого кишківника свині, як найбільш близьку за складом і анатомією до такої людини. Експерименти проводили протягом 60 хв, щоб уникнути втрат і зміни характеристик біооб'єкта. Сила адгезії гелю на основі Na-КМЦ до слизової оболонки дорівнює 6000 Па, тоді як для найбільш використовуваних мукоадгезивних полімерів вона знаходиться в межах 2000 - 9000 Па (Харенко А.В., 2014), і свідчить про високі мукоадгезивні властивості отриманого препарату.

В біологічних експериментах оцінювали ефективність терапевтичної дії гелю з лізоцимом і кверцетином при запаленні слизової оболонки порожнини рота щурів в індометациновому тесті. У табл. 4 наведені результати визначення біохімічних маркерів запалення в яснах щурів в умовах експериментального гінгівіту і вплив іммобілізованого лізоциму і кверцетину на їх рівень.

У щурів з гінгівітом достовірно збільшується рівень малонового діальдегіду (МДА), еластази і уреази, однак знижується рівень лізоциму і каталази. Використання гелю з лізоцимом і кверцетином нормалізує вищезазначені показники.

Таблиця 4

Вплив аплікацій мукодгезивних гелів на біохімічні показники ясен щурів з гінгівітом

№	Група	МДА, ммоль/кг	Еластаза, мккат/кг	Уреаза, мккат/кг	Лізоцим, од/кг	Каталаза, мкат/кг
1	Контроль	10,8±0,3	40,0±2,0	2,03±0,31	364±67	5,75±0,28
2	Гінгівіт	15,5±0,8 p<0,01	54,2±5,1 p<0,05	3,83±0,25 p<0,01	220±31 p<0,05	4,87±0,19 p<0,01
3	Гінгівіт лізоцим 5 мг/см ³	12,1±0,6 p>0,05 p ₁ <0,05	41,0±4,0 p>0,5 p ₁ <0,05	2,28±0,46 p>0,3 p ₁ <0,05	312±52 p>0,3 p ₁ >0,05	5,14±0,26 p>0,05 p ₁ >0,3
4	Гінгівіт кверцетин 2 мг/см ³	11,5±0,6 p>0,1 p ₁ <0,01	47,6±3,9 p>0,05 p ₁ >0,05	2,91±0,30 p>0,05 p ₁ <0,05	279±38 p>0,05 p ₁ >0,05	5,49±0,27 p>0,3 p ₁ >0,05
5	Гінгівіт лізоцим (5 мг/см ³) + кверцетин (2 мг/см ³)	10,1±0,5 p>0,05 p ₁ <0,01	40,8±4,0 p>0,5 p ₁ <0,05	2,12±0,32 p>0,5 p ₁ <0,01	356±52 p>0,5 p ₁ <0,05	5,68±0,28 p>0,5 p ₁ <0,05

Примітка: p - по відношенню до гр. 1; p₁ - по відношенню до гр. 2; M ± m, у всіх групах n = 7

Кріоімобілізація лізоциму в полівініловий спирт. Кріогель полівінілового спирту (КГПВС) використовується в біотехнології для іммобілізації клітин, оскільки має достатню ємність і розмір пор. Однак кріогелі є придатними носіями і для іммобілізації ензимів, оскільки вони економічні, нетоксичні, нерозчинні в фізіологічних умовах, утворюють прозорі покриття, перспективні для застосування в репаративній медицині (Lozinsky V.I., 2002; Колесникова Е.С., 2017). Кріогель утворюється з водного розчину полівінілового спирту (ПВС) в процесі заморожування - розморожування внаслідок численних водневих зв'язків. ПВС є стереорегулярним полімером з синдіотактичними і ізотактичними ділянками. Синдіотактичні ділянки відповідальні за формування водневих зв'язків, а ізотактичні утворюють внутрішньо-молекулярні зв'язки.

Для іммобілізації лізоциму були виготовлені 10% розчини ПВС різної молекулярної маси: 30, 60, 120 кДа. Однак тільки при використанні полімеру з молекулярною масою 120 кДа спостерігали утворення однорідного, прозорого, пружного кріогелю.

В результаті кріоімобілізації лізоциму отримані покриття пролонгованої дії з гідролітичною активністю (табл. 5).

Таблиця 5

Характеристика кріогеля з лізоцимом

Показник	Результат визначення
Мольне відношення лізоцим: ПВС	1: 35
Гідролітична активність, од в плівці	8125 ± 340 (*P<0,005)
Ступінь включення протеїну, %	97 ± 2,5 (*P<0,005)
Площа, см ²	0,8 ± 0,04 (*P<0,05)
Товщина, мм	3,0 ± 0,1 (*P<0,01)
Середня маса плівки, мг	8 ± 0,3 (*P<0,01)
Вміст води, %	93 ± 3 (*P<0,01)
Колір	Безбарвні, прозорі
Час розчинення у воді, фіз. розчині, хв	нерозчинні
Час зберігання, міс	3 міс (94 ± 2,3 % *P<0,01) збереження активності

* - достовірність відмінностей між серіями експериментів для $n = 5$

Максимальний вихід лізоциму з КГПВС спостерігається через 1 годину інкубації при температурі 37 °C (рис. 11). Процес відбувається рівномірно - 50% за перші 30 хв, 50% в наступні, і пояснюється пористою морфологією носія, що забезпечує дифузійно-незатруднене вивільнення в зовнішнє середовище.

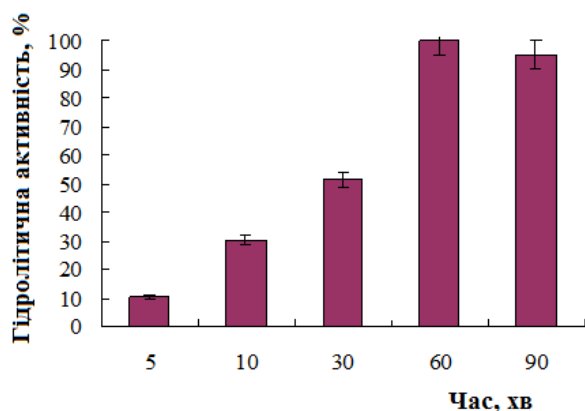


Рис. 11. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого в кріогель лізоциму від часу інкубації в Na-фосфатному буферному розчині, рН 6,2, 0,1 моль/дм³ при температурі 37 °C

Пористу структуру КГПВС з іммобілізованим лізоцимом підтверджують і результати, отримані методом скануючої електронної мікроскопії (SEM). На рис. 12 просвічують пори кріогелю сферичної форми, розміром до 20 мкм.

При дослідженні залежності гідролітичної активності лізоциму від температури (20-80 °C), що вивільнився з КГПВС, не спостерігалось деформації термопрофілю активності, і температурний оптимум залишався незмінним (55 °C). Термостабільність іммобілізованого лізоциму в порівнянні з вільним ензимом також істотно не відрізняється, константи термоінактивації становлять $K_{in} = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, $K_{in} = 3,6 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, відповідно. Таким чином, кріоіммобілізація в полівініловий спирт не впливає на термічні характеристики ензиму.

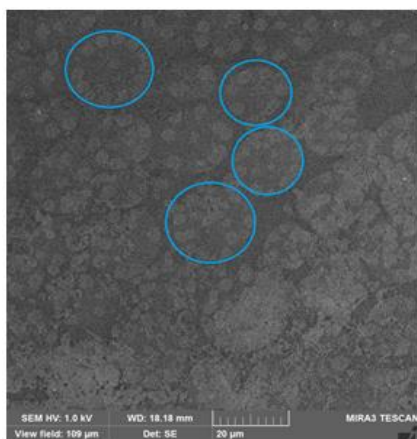


Рис. 12. SEM-фотографії поверхні кріогелю ПВС з іммобілізованим лізоцимом (20 µm) (пори носія окреслені).

pH-профіль гідролітичної активності іммобілізованого в кріогель лізоциму розширюється на 1-1,5 одиниці в область кислих значень, що пояснюється зміною мікрооточення ензиму (рис. 13а). Крім того, іммобілізований препарат зберігає високу активність ($\approx 80\%$) в кислому середовищі протягом 3 год, тоді як вільний лізоцим активний не більше 1 год (рис. 13б).

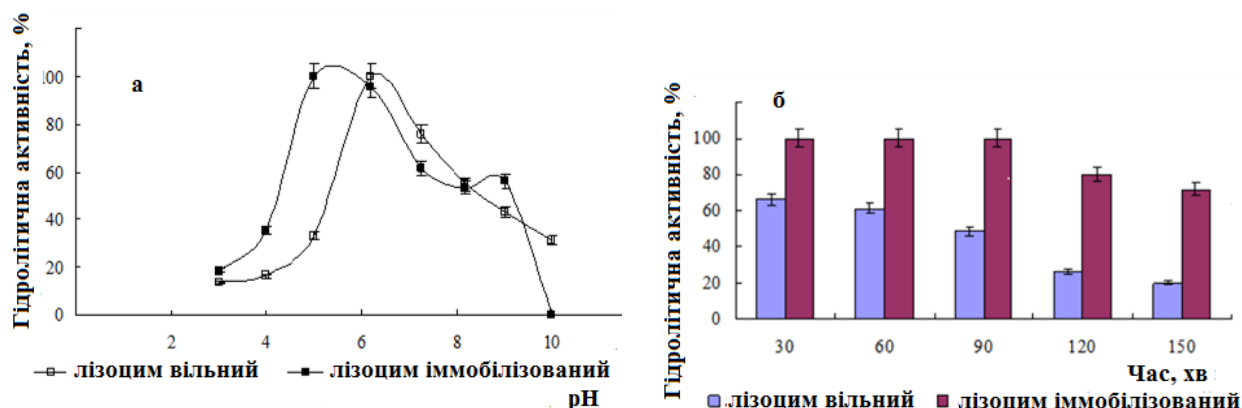


Рис. 13. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого у кріогелі лізоциму від pH інкубаційного середовища (а) і від часу інкубації при pH 5,5 (б)

Дослідження антимікробної дії кріогелю з іммобілізованим лізоцимом показало, що препарат проявляє бактерицидну, антимікробну дію стосовно *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (табл. 6).

Найбільш чутливим до дії іммобілізованого лізоциму виявилися бактерії *Staphylococcus aureus*, а найменш - *Pseudomonas aeruginosa*, діаметри зони затримки росту становили 1,7 см і 1,1 см, відповідно.

Протизапальну дію КГПВС з лізоцимом вивчали на 30 щурах лінії Вістар, які попередньо отримували на слизові оболонки порожнини рота (СОПР) аплікації ліпополісахариду (ЛПС), через 30 хв здійснювали аплікацію кріогелю. У табл. 7 наведені результати визначення *in vitro* стану СОПР в гомогенаті за відповідними показниками.

Антимікробна дія кріогелю з лізоцимом** (n=5)

Тест-штам мікроорганізму	Д.з.з.р., см ($M \pm m$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 F-49	$1,7 \pm 0,15$ (* $P < 0,05$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 415	$1,1 \pm 0,10$ (* $P < 0,05$)
<i>Escherichia coli</i> 055 K59912 / 4	$1,2 \pm 0,13$ (* $P < 0,01$)
<i>Candida albicans</i> ATCC 885 — 653	$1,3 \pm 0,11$ (* $P < 0,05$)

Д.з.з.р. - діаметр зони затримки росту; ** кріогель без лізоциму не чинить антимікробної дії

Таблиця 7

Вплив кріогеля з лізоцимом на стан слизової оболонки щоти щурів після аплікації ліпополісахариду

Показник	Норма (без аплікації)	ЛПС (контроль)	Кріогель з лізоцимом	Зміна показників, %
Еластаза, мккат/кг	31 ± 2	40 ± 1 $p < 0,01$	34 ± 2 $p > 0,05$; $p_1 < 0,05$	66,0
Уреаза, мккат/кг	$0,82 \pm 0,09$	$1,87 \pm 0,10$ $p < 0,001$	$1,32 \pm 0,10$ $p < 0,01$; $p_1 < 0,01$	52,4
Лізоцим, од/кг	302 ± 26	83 ± 9 $p < 0,001$	112 ± 12 $p < 0,01$; $p_1 > 0,05$	13,2
Каталаза, мкат/кг	$8,13 \pm 0,73$	$7,12 \pm 0,47$ $p > 0,1$	$7,67 \pm 0,70$ $p > 0,5$; $p_1 > 0,3$	-
Малоновий діальдегід, ммоль/кг	$11,06 \pm 1,15$	$15,51 \pm 1,35$ $p < 0,05$	$13,07 \pm 1,12$ $p > 0,3$; $p_1 > 0,2$	28,4
Гіалуронова кислота, мг/кг	$788,7 \pm 64,1$	$505,7 \pm 36,2$ $p < 0,05$	$688,7 \pm 62,1$ $p > 0,05$; $p_1 < 0,05$	64,9

Примітка: p - в порівнянні з нормою; p_1 - в порівнянні з ЛПС (контроль)

В щоти активність еластази при дії ЛПС достовірно підвищується. Аплікація кріогелю впливає на цей показник і достовірно (на 66 %) знижує активність еластази; активність уреазу знижується на 52,4 %, лізоциму зростає на 13,2 %. Концентрація МДА знижується на 28,4 % і на 64,9 % збільшується вміст гіалуронової кислоти. Отже препарат проявляє протизапальний і антиоксидантний ефекти після дії ЛПС на слизові оболонки порожнини рота.

Розробка мукоадгезивних плівкових форм іммобілізованого лізоциму. Носіями для отримання плівкових форм лізоциму були обрані мукоадгезивні полімери медичного призначення - желатин і Na-КМЦ, що характеризуються високою гідрофільністю, великою кількістю функціональних груп.

Дослідження взаємодії лізоциму з окремими компонентами полімерної матриці (желатин, КМЦ, КМЦ + желатин) описані вище. З огляду на отримані результати реологічних, мас-спектрометричних і спектрофотометричних експериментів, розроблено ефективний метод іммобілізації ензиму.

При масових співвідношеннях лізоцим: желатин 1:3,5 і 1:5 спостерігається повне включення білка зі збереженням високої активності ензиму. Основні характеристики плівок наведені в таблиці 8. Слід зазначити сильні мукоадгезивні властивості отриманого препарату, так, сила його адгезії до слизової оболонки становить 4380 Па.

Таблиця 8

Характеристика мукоадгезивних плівок з лізоцимом

Показник	Результат визначення
Гідролітична активність плівки, од	45050±1238 (*P<0,05)
Вміст лізоциму в плівці, мг	2,0 (*P<0,05)
Площа, см ²	0,8±0,1
Товщина, мм	0,35±0,02
Середня маса плівки, мг	8±0,02 (*P<0,05)
Органолептичні показники	прозорі, гладкі, жовті
Час розчинення у фіз. розчині, хв при 37 °С	18±0,5 (*P<0,01)
Вміст води, %	10,0±1,7 (*P<0,01)
Сила мукоадгезії, Па	4380±250 (*P<0,05)

* - достовірність відмінностей між серіями експериментів для $n = 5$

Результати SEM показали деяку нерівномірність поверхні желатину / Na-КМЦ з іммобілізованим лізоцимом (рис. 14). Полімерна система містить агломерати різного розміру, але не більше 3 мкм в діаметрі (якщо допустити, що частинки мають сферичну форму).

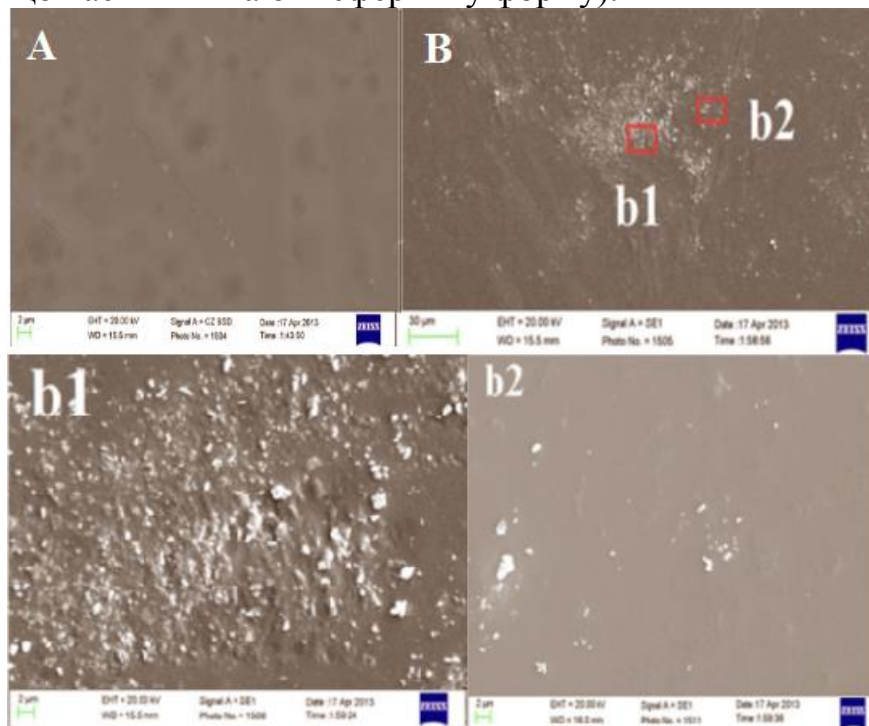


Рис. 14.
Мікрофотографії
поверхні плівок
желатину/Na-КМЦ
(А) і желатину/Na-
КМЦ з включеним
лізоцимом (В - 3
мкм, b1, b2 - 2 мкм),
отримані SEM

Динаміка вивільнення ензиму з полімерної матриці свідчить, що 100% вихід спостерігається через 2 години інкубації в водному розчині (рис. 15).

Пролонгований кількісний вихід ензиму з полімерної матриці поряд зі зміною в'язкості желатину, дисоціацією олігомерів лізоциму на мономери, підтверджує наявність взаємодій білкових макромолекул.

Показано розширення рН-профілю і рН-оптимуму іммобілізованого ензиму в область кислих (на 0,5 од.) і лужних (на 1,0 од.) значень (рис. 16).

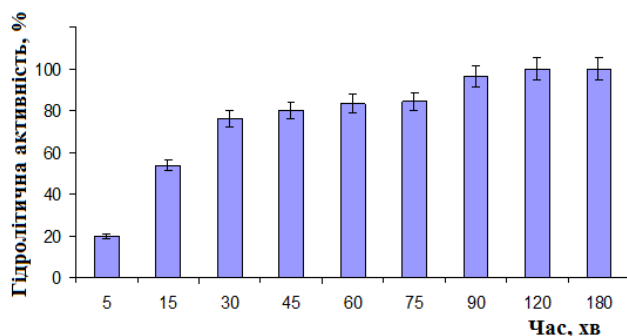


Рис. 15. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації (0,1 моль/дм³ Na-фосфатний буферний розчин, рН 6,2, 37°C)

Порівняння термостабільності (рис. 17), свідчить про зниження константи термоінактивації для іммобілізованого ензиму в 1,7 раз ($K_{in\text{ віль}} = 9,2 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$, $K_{in\text{ ім}} = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$), тобто МАП (мукоадгезивні плівки) з лізоцимом більш стійкі до тривалої дії високих температур (80 °C).

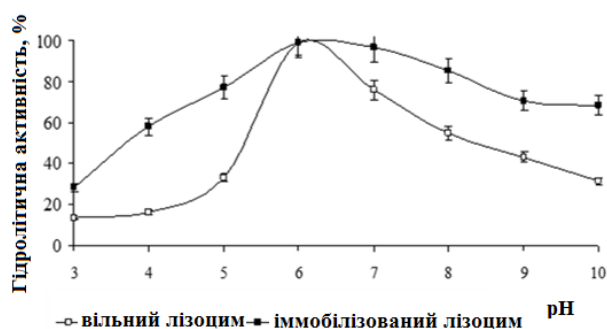


Рис. 16. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від рН інкубаційного середовища

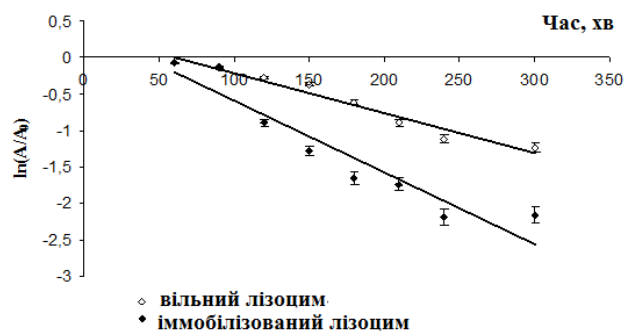


Рис. 17. Термостабільність вільного і іммобілізованого лізоциму при 80°C (0,1 моль/дм³ фосфатний буферний розчин, рН 6,2)

Дослідження рН-стабільності ензиму в умовах, наближених до ацидозу (рис. 18) свідчить, що активність як іммобілізованого, так і вільного лізоциму з часом суттєво знижується, однак активність МАП з лізоцимом на 24% перевищує таку вільного ензиму.

Час зберігання мукоадгезивних плівок з лізоцимом вивчали протягом 3-х років (рис. 19). Зразки зберігали герметично упакованими при температурі 4 °C. Показано, що вільний лізоцим повністю втрачає гідролітичну активність протягом 14-17 днів в буферному розчині, тоді як іммобілізований – зберігає її на рівні 95-100% протягом 3 років.

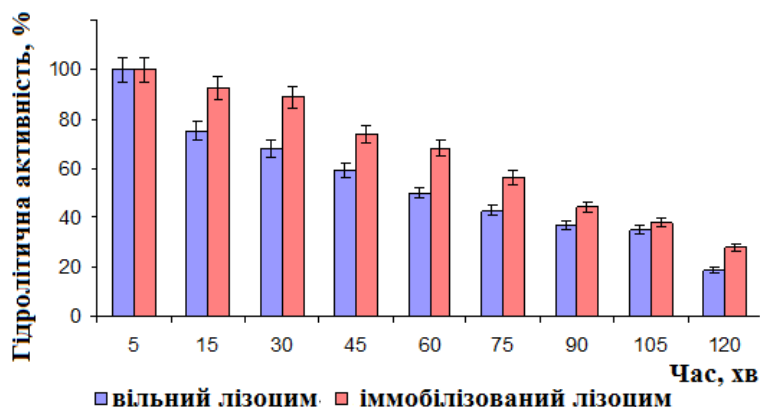


Рис. 18. Залежність гідролітичної активності вільного і іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при рН 5,5 (0,1 моль/дм³ Na-фосфатний буферний розчин)

Стерилізацію МАП з лізоцимом γ -опроміненням проводили на ЗАТ «Гемопласт» (м. Білгород - Дністровський) відповідно до ДСТУ Р ІСО 11137-2000 «Стерилізація виробів медичного призначення» дозами 10, 18, 28 кГр. Вибір доз обумовлено «Вимогами до валідації і поточного контролю».

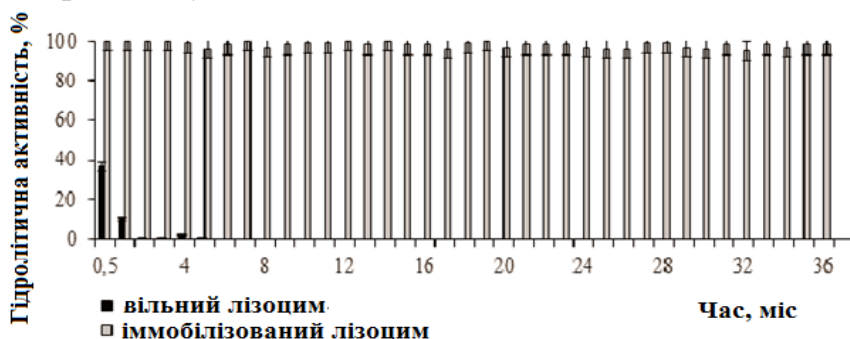


Рис. 19. Гідролітична активність розчину вільного і іммобілізованого лізоциму в процесі зберігання (4 °C)

Слід зазначити радіопротекторну дію желатину як полімерної матриці, оскільки іммобілізований ензим в усіх випадках зберігав 100 % гідролітичної активності (табл. 9).

Таблиця 9

Вплив стерилізації γ - опроміненням на гідролітичну активність МАП з лізоцимом

Доза γ -опромінення, кГр	Гідролітична активність*	
	од/мг	%
10	45050±2252	100
18	45019±2250	100
28	44878±2244	100

*відносно активності лізоциму в плівці до стерилізації (45050 од/мг ензиму).

Вплив МАП з лізоцимом на перебіг запальних процесів в СОПР, представлено на рис. 20. Показано, що моделювання стоматиту бджолоиною отрутою викликає збільшення рівня маркерів запалення (еластази і МДА), суттєве (в 2,6 рази) зростання активності уреазы і виражену тенденцію до збільшення активності лізоциму.

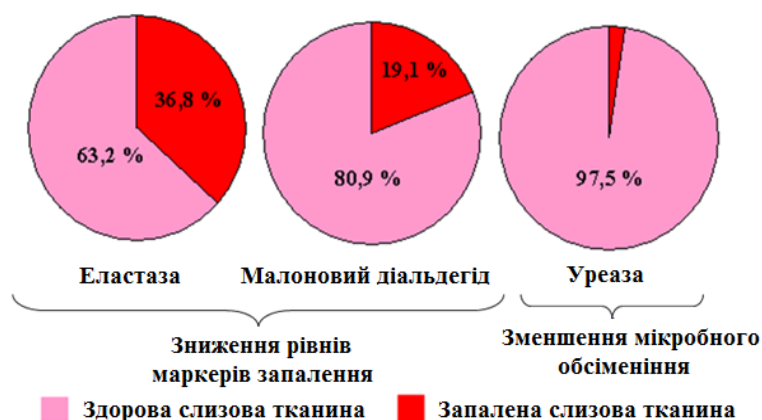


Рис. 20. Вплив МАП з лізоцимом на біохімічні показники СОПР щурів при експериментальному стоматиті

Отримані мукоадгезивні лікарські плівки з лізоцимом ефективні в лікуванні експериментального стоматиту у щурів: рівні маркерів запалення (еластази, МДА) та мікробне обсіменіння слизових оболонок знижуються на 63,2, 80,9 і 97,5%, відповідно.

У п'ятому розділі «Біотехнологія створення комплексного антибактеріального препарату сублінгвального застосування». Перспективною лікарською формою лізоциму для місцевого застосування в комплексі з іншими біологічно активними речовинами є таблетки. В Україні таблетовані форми ензиму представлені препаратами - Лізак («Фармак», Україна), Гексаліз («Lab. Bouchara-Recordati», Франція) і Лісобакт («Bosnalijek», Боснія і Герцеговина). Застосування технології іммобілізації з використанням мукоадгезивних полімерних матриць медичного призначення для цілеспрямованої стабілізації ензиму і пролонгування його дії визначає актуальність досліджень в даній області. Ґрунтуючись на результатах власних досліджень по створенню іммобілізованих БАР, перспективних для використання в медицині (Романовська І., 2012; Dekina S., 2016), спільно проведених і вищеописаних робіт з колегами ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України», детальному вивченні наукової літератури, визначили основні підходи до розробки комплексного таблетованого препарату іммобілізованого лізоциму. Принциповими критеріями при виборі полімерної матриці були відсутність токсичності, економічність, мукоадгезивні властивості, використання у фармацевтичній, медичній і харчовій промисловості. Основними діючими речовинами є лізоцим і кверцетин. Позитивні терапевтичні властивості композиції лізоцим-кверцетин були показані раніше в дослідженнях по розробці мукоадгезивного гелю (Романовська І., 2015).

Гідролітична активність, рН-оптимум і термооптимум лізоциму в присутності полімерів представлено у табл. 10. Виходячи з отриманих результатів очевидно, що тільки при іммобілізації в крохмаль активність лізоциму знижується (82,5% від вихідної). У разі інших полімерів відмінності недостовірні. Крім того, слід зазначити, що взаємодію лізоциму з Na-КМЦ і желатином раніше було підтверджено реологічними, оптичними і мас-спектрометричними методами.

Таблиця 10

Вплив полімерів на біохімічні властивості лізоциму

Показник	ЛІЗ (К)	ПВП	Na-КМЦ	Крохмаль	Желатин
Гідролітична активність*, од/мг, $M \pm m$	20000 \pm 1000	19000 \pm 870	18500 \pm 850	16500 \pm 1050	19300 \pm 790
pH-оптимум	6,0-7,5				5,0-8,0
Термооптимум, °C	45-55				

* $P < 0,05$ при $n=5$

В'язкість розчину Na-КМЦ при додаванні лізоциму змінюється на 22,3% з високим ступенем достовірності ($P < 0,002$ при $n = 9$) (Dekina S., 2015). Стабілізуючий лізоцим вплив полімерів зазначено в області кислих і лужних значень pH, при тривалому витримуванні ферменту в умовах, наближених до ацидозу, протекторна дія желатину - при радіаційній стерилізації, довготривале зберігання без втрати активності (3 роки). Крім того, желатин є перспективним не тільки як носій для іммобілізації лізоциму, а й джерелом цінних для організму людини білків і амінокислот. Основні кислоти желатину: гліцин (~ 27%), пролін (~ 16%), оксипролін (~ 14%), глютамінова кислота (~ 12%), аргінін (~ 9%), лізин (~ 5%) (Veis A., 1964). Основні фізико-хімічні характеристики функціонування лізоциму, іммобілізованого в желатин і Na-КМЦ (pH- і термооптимуми активності, pH-, термостабільність гідролітичної активності), представлені раніше при розробці мукоадгезивних плівкових форм ензиму. Описані результати досліджень обумовили вибір желатину і Na-КМЦ як матриці для іммобілізації лізоциму і кверцетину з подальшим отриманням таблеткових сумішей.

Визначення чутливості тест-штамів, рекомендованих Державною фармакопеею України, до діючих речовин таблетки проводили сумісно з лабораторією мікробіології НТЦ «Водообробка». Результати проведених досліджень представлені в табл. 11 (*s* - м/о чутливі; *i* - м/о з проміжною чутливістю; *r* - м/о стійкі). Встановлено антимікробну дію лізоциму, що проявляється в різному ступені, в залежності від роду і штаму мікроорганізму; показано, що додавання хлоргексидину біглюконату у всіх випадках (щодо грамнегативних, грампозитивних бактерій і дріжджоподібних грибків) сприяє розширенню спектра антимікробної дії ензиму; введення комплексу Na_2EDTA в дану композицію більшою мірою проявляється по відношенню до грамнегативних бактерій *E. coli* і дріжджоподібних грибків *Candida albicans*.

Технологічні характеристики субстанцій і технологія іммобілізації обумовили вибір вологого гранулювання для створення таблеткових сумішей з лізоцимом і кверцетином. Пошук прийнятних композицій складових таблетки вели цілеспрямовано: спочатку було обрано дозування діючих речовин, виходячи з рекомендованих терапевтичних доз, потім наповнювачі,

зв'язуючі речовини і дезінтегранти, ароматизатори. У разі незадовільних показників переходили до наступного складу. Результати представлені в таблиці 12.

Як зв'язуючі речовини використовували ПВП (повідон) у вигляді 5% водного розчину (№ 1, 2), NaКМЦ 0,1% (№ 3, 4); 1,5% (№ 5); 3,0% (№ 6); крохмаль (№ 7 і 8) або желатин (№9).

Таблиця 11

**Чутливість мікроорганізмів до лізоциму та інших компонентів
таблеткових сумішей**

Мікроорганізм	ЛІЗ	БГХГС	ЛІЗ +БГХГС	ЛІЗ +БГХГС + Na ₂ ЕДТА	ЛІЗ + Na ₂ ЕДТА	Na ₂ ЕДТА	Na ₂ ЕДТА +БГХГС
<i>E.coli</i> ОНУ 13	s	s	s	s	s	s	s
<i>E.coli</i> ОНУ 174	s	i	s	s	s	r	s
<i>E.coli</i> ОНУ 90 (УКМВ-906)	s	s	s	s	s	s	s
<i>E.coli</i> ОНУ 447 (ATCC 25922)	s	s	s	s	s	i	i
<i>E.coli</i> ОНУ 448 (C 600)	s	s	s	s	i	r	s
<i>E.coli</i> ОНУ 449 (BK)	s	s	s	s	s	i	s
<i>E.coli</i> ОНУ 450 (BE)	i	s	s	s	r	s	s
<i>S. aureus</i> ОНУ 443 (ATCC 6538)	s	r	s	s	s	r	r
<i>S. aureus</i> ОНУ 445	s	s	s	s	s	i	s
<i>S. aureus</i> ОНУ 223	r	s	s	s	r	r	s
<i>S. aureus</i> ОНУ 229	i	s	s	s	r	r	s
<i>P.aeruginosa</i> ОНУ 211	s	s	s	r	i	r	s
<i>P.aeruginosa</i> ОНУ 446	s	s	s	s	s	r	s
<i>P.aeruginosa</i> ОНУ 441	r	s	s	r	r	r	s
<i>P.aeruginosa</i> ОНУ 442	r	s	s	s	i	r	s
<i>C. albicans</i> ОНУ 425	r	s	s	i	r	r	s
<i>C. albicans</i> ОНУ 426	s	s	s	s	i	r	s
<i>C. albicans</i> ОНУ 427	i	s	s	s	s	i	s
<i>C. albicans</i> ОНУ 428	i	s	s	s	s	r	s
<i>C. albicans</i> ОНУ 429	s	s	s	s	s	i	s

В результаті отримані гранули жовтого кольору, без видимих сторонніх включень з кількісним вмістом лізоциму і кверцетину. Концентрація полімерів і їх кількість при вологій грануляції впливають на час розчинення гранул, який можна варіювати шляхом зміни і кількості полімерів при гранулюванні. Наприклад, при використанні Na-КМЦ в кількості 4,5 -9 мг і більше гранулят не розчиняється, а при додаванні 0,2 мг час розчинення становить 5 хв. З желатином час розчинення 20-22 хв (10 см³ дистильованої води, без перемішування при 20 °С).

В наступному підрозділі «Розробка методів аналізу компонентів таблеткових сумішей» виявлено фармацевтичну несумісність хлоргексидину біглюконату, що кількісно не визначається комплексом спекрофотометричних, хроматомас-спектрометричних методів, через взаємодію з лізоцимом, кверцетином, манітом, полівінілпіролідом і лактозою, тому хлоргексидину біглюконат виключили з числа компонентів препарату.

Дослідження біологічної дії таблеткових сумішей, що містять лізоцим, на тканини порожнини рота щурів після аплікації гелю ліпополісахариду

проводили, використовуючи як референс-препарат таблетки «Лізак» (Фармак, Україна). Результати наведені в табл. 13.

Таблиця 12

Склад модельних гранулятів для таблетки з лізоцимом

Компонент	Маса компонентів в різних складах, мг								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Лікарські речовини									
Лізоцим	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	15,0
Кверцетин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,00	3,0	3,0	5,0
Хлоргексиди- ну біглюконат	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	5,0
Na ₂ ЕДТА	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	-	-	-
Наповнювачі									
Лактоза	114,9	154,5	149,5	155,5	160,0	164,1	-	-	-
Кальцію цитрат тригідрат	-	-	-	-	-	-	210,0	239,3	360,0
Дезінтегранти									
Маніт	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	-	-	-
Крохмаль	-	-	-	-	-	-	34,5	34,5	-
Смакові добавки									
Ароматизатор «Лимон»	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-	0,6	1,2
Сахароза	-	-	-	-	-	-	30,0	-	3,0
Зв'язуючі									
Натрієва сіль карбоксимети лцеллюлози*	-	-	15	9	4,5	0,4	-	-	
Повідон К-17**	50	10	-	-	-	-	-	-	
Желатин	-	-							210,0
Змашувальні									
Кальцію стеарат	-	-	-	-	-	-	4,5	4,5	0,8
Всього	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	300,0	300,0	600,0

Запропонована композиція, в якій лізоцим поєднується з кверцетином і мукоадгезивною полімерною матрицею на основі желатину і Na-КМЦ, підвищує в слизовій оболонці щоти рівень лізоциму в 2,2-2,5 рази, тоді як препарат «Лізак» (в 1,2 рази); достовірно знижують рівень МДА: «Лізак» на 33%, іммобілізований лізоцим на 56%. В результаті цього значно підвищується співвідношення активності каталази та концентрації МДА як антиоксидантно-прооксидантного індексу (АПІ): після апікацій «Лізак» на 51%, іммобілізованого лізоциму з кверцетином - на 145% (табл. 13).

Таблиця 13

**Вплив лізоцимвмісних сумішей на стан слизової оболонки щоки шурів
після аплікації ліпополісахариду**

Показник	Норма (без аплікації)	ЛПС (контроль)	Лізоцим+кверцетин (1 мг/кг и 0,2 мг/кг)	ЛПС+ «Лізак», (1 мг/кг)
Еластаза	$35,3 \pm 4,5$	$28,4 \pm 1,3$ $p < 0,05$	$27,2 \pm 1,3$ $p < 0,05; p_1 > 0,3$	$25,5 \pm 1,2$ $p < 0,05;$ $p_1 > 0,05$
Уреаза	$0,45 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,11$ $p > 0,3$	$0,35 \pm 0,10$ $p > 0,3; p_1 > 0,3$	$0,63 \pm 0,08$ $p > 0,05; p_1 > 0,2$
Лізоцим	163 ± 17	137 ± 16 $p > 0,2$	308 ± 18 $p < 0,001; p_1 < 0,001$	160 ± 8 $p > 0,7; p_1 > 0,05$
Каталаза	$4,01 \pm 0,31$	$5,19 \pm 0,34$ $p < 0,05$	$5,68 \pm 0,37$ $p < 0,05; p_1 > 0,2$	$5,25 \pm 0,30$ $p < 0,05; p_1 > 0,5$
Малоновий діальдегід	$5,64 \pm 0,79$	$14,75 \pm 1,50$ $p < 0,01$	$6,54 \pm 0,74$ $p > 0,3; p_1 < 0,01$	$9,87 \pm 0,39$ $p < 0,05; p_1 < 0,05$
АПІ	$7,11 \pm 0,82$	$3,52 \pm 0,34$ $p < 0,05$	$8,68 \pm 0,71$ $p > 0,05; p_1 < 0,05$	$5,32 \pm 0,38$ $p < 0,05;$ $p_1 < 0,05$

Примітка: p - в порівнянні з нормою; p_1 - в порівнянні з ЛПС (контроль).

В результаті проведеного комплексу досліджень найбільш перспективні композиції були передані згідно договору про науково-технічне співробітництво в ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» для впровадження на НВА «Одеська біотехнологія» у вигляді біологічно активної добавки «Лізоцим ФОРТЕ».

В розділі 6 «Дослідження кінетичних параметрів вільного і іммобілізованого лізоциму» приділили увагу порівнянню кінетичних характеристик вільного і іммобілізованого лізоциму. У таблиці 14 показано, що іммобілізація лізоциму в досліджувані полімери (желатин, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози і полівініловий спирт) проявляється у збільшенні константи Міхаеліса K_m , максимальної швидкості реакції V_{\max} , співвідношення K_m/V_{\max} (дані оримані в координатах Хейнса) і каталітичної константи $k_{\text{кат}}$ і пояснюються перехідною активацією ензиму.

Таблиця 14

Кінетичні параметри вільного і іммобілізованого лізоциму

Показник	Лізоцим	Желатин+ЛІЗ	КГПВС + ЛІЗ	NaКМЦ+ ЛІЗ
K_m , мг/дм ³	40,9	75,3	114,9	139,9
V_{\max} , од/мг у хв	67599	84974	169432	146306
$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	$1,932 \cdot 10^4$	$2,428 \cdot 10^4$	$4,842 \cdot 10^4$	$4,181 \cdot 10^4$
$k_{\text{кат}}/K_m$	$4,721 \cdot 10^2$	$3,224 \cdot 10^2$	$4,214 \cdot 10^2$	$2,989 \cdot 10^2$
$K_{\text{Па}}$, моль/дм ³	-	$1,061 \cdot 10^{-5}$	$7,080 \cdot 10^{-6}$	$2,482 \cdot 10^{-7}$ - $3,191 \cdot 10^{-8}$

Зменшення ж співвідношення $k_{\text{зам}}/K_M$ свідчить про зменшення швидкості зв'язування іммобілізованого ферменту з субстратом. Значення константи перехідної активації $K_{\text{Па}}$ (Крупянко В.И., 2007) знайдені для іммобілізованих зразків лізоциму за даними трьох методів визначення K_M і $V_{\text{макс}}$.

Таким чином, кінетичні параметри узгоджуються з даними попередніх досліджень щодо взаємодії ензиму з носіями і свідчать про різний вплив полімерів на каталітичні характеристики лізоциму (желатину меншою мірою, ніж натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне обґрунтування та запропоновані нові підходи у вирішенні найважливішої наукової проблеми розвитку резистентності мікроорганізмів до антибіотиків шляхом проведення досліджень в області іммобілізації лізоциму - ензиму антимікробної і імуномодулюючої дії. На основі проведених досліджень та отриманих результатів сформульовані наступні висновки:

1. Встановлено, що запропонована модифікація способу виділення лізоциму з білка курячого яйця дозволяє отримувати в лабораторних умовах ензим з чистотою 98% і гідролітичною активністю 22025 од/мг, що відповідає такій фірмового препарату «AppliChem», перспективний для використання в біотехнологічних і біомедичних цілях.

2. Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель з використанням електронегативності за Полінгом, ентропії і ентальпії іонів металів як дескрипторів, що описує інгібуючий вплив металів і дозволяє з достатньою вірогідністю прогнозувати активність ензиму.

3. Показано, що стабілізація ензиму в розчинах декстрану і гідроксипропілметилцелюлози шляхом утворення іонних зв'язків між карбоксильними групами полімерів і аміногрупами лізоциму дозволила розробити мукоадгезивні очні краплі «штучна сльоза з лізоцимом», перспективні як для профілактики «синдрому сухого ока», так і для терапії травматичних кератитів з прискоренням ліквідації запалення і процесу епітелізації порівняно з контролем у 1,5 рази.

4. Шляхом іммобілізації лізоциму в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози розроблено мукоадгезивний гель, терапевтична ефективність якого посилена введенням біофлавоноїду кверцетину. Отриманий гель має високі адгезійні властивості до слизової оболонки (6000 Па), пролонговану дію (3 год), зберігає активність в кислому середовищі (рН 5,5) і при тривалому зберіганні (1,5 роки), забезпечує лікувально-профілактичний ефект при захворюваннях пародонту.

5. Показано, що метод кріоіммобілізації лізоциму в полівініловому спирті дозволяє отримати покриття з кількісним збереженням білка і високою гідролітичною активністю ензиму. Препарат відрізняється розширеним на 1-1,5 одиниці в область кислих значень рН-профілем

активності, стабільний в кислому середовищі (pH 5,5), зберігає 95% активності протягом 3 місяців, проявляє антимікробну дію стосовно тест-штамів *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* і має протизапальну дію при модельованому ліпополісахаридом запаленні слизових оболонок порожнини рота.

6. Встановлено, що іммобілізація лізоциму в комплексну матрицю на основі желатину і натрієвої солі карбоксиметилцелюлози сприяє отриманню мукоадгезивних плівкових форм сайт-специфічного введення, пролонгованої дії (3 год), тривалого строку зберігання (3 роки). Препарат ефективний в лікуванні експериментального стоматиту у щурів зі зниженням показників запалення (активності еластази, концентрації малонового діальдегіду) і маркеру мікробного обсіменіння слизових оболонок (активності уреаз) на 63,2, 80,9 і 97,5%, відповідно.

7. На основі комплексу теоретичних, технологічних і аналітичних досліджень розроблені таблеткові суміші іммобілізованого лізоциму і кверцетину - препарату лікувально-профілактичної дії. Біологічно активна добавка «Лізоцим-ФОРТЕ» має пролонговану антимікробну, антиоксидантну, імуномодулюючу дію і впроваджена на підприємстві НПА «Одеська біотехнологія» (Технічні умови України (ТУ У) 10.8-27420386-004: 2016).

8. Досліджені кінетичні параметри функціонування лізоциму після іммобілізації свідчать про вплив полімерів (желатину в меншій мірі, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози і полівінілового спирту), який проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і співвідношення $K_M/V_{\text{макс}}$, що пояснюється перехідною активацією ензиму.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. И. Романовская, С. Декина, С. Андронати. Конструирование иммобилизованных белковых веществ. – Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG., 2012. – 335 с.

Статті у фахових закордонних виданнях:

2. Декина С.С., Демьяненко С.А., Левицкий А.П., Романовская И.И. Экспериментальная оценка противовоспалительного действия мукоадгезивных лечебных пленок с лизоцимом // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - № 8. – С. 39-42 (РИНЦ).

3. Dekina S.S., Romanovskaya I.I., Ovsepyan A.M., Balashova M.V. Sterilization of ocular medical inserts with immobilized proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2015. – V.49 (4). – P.275-279 (Scopus, Web of Science).

4. Dekina S., Romanovska I., Ovsepyan A., Tkach F., Muratov E. Gelatin/carboxymethyl cellulose mucoadhesive films with lysozyme: development

and characterization // Carbohydrate Polymers. – 2016. – V. 147. – P. 208–215 (Scopus, Web of Science).

5. Romanovskaya I.I., **Dekina S.S.**, Sotnikova E.P., Abramova A.B. Preparation and properties of lysozyme-containing eye drops for tear-substitutive therapy // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2019. – T.53, №8.- P. 755-758 (Scopus, Web of Science).

Статті у вітчизняних фахових виданнях:

6. **Декіна С.С.**, Левицький А.П., Романовська І.І., Дем'яненко С.О. Протизапальна дія мукоадгезивних плівок з іммобілізованим лізоцимом на слизову оболонку щоби щурів // Одеський медичний журн. -2011. - № 4. – С. 7-9 (Ulrich's Periodicals Directory).

7. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Громовой Т.Ю. Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // Biopolymers and cells. – 2011. – V. 27, № 6. – P. 442-445 (Scopus; Web of Science та ін.).

8. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Артеменко А.Г., Романовська І.І., Кузьмін В.Є. Дослідження впливу іонів металів на активність лізоциму методом QSAR аналізу// Мікробіологія і біотехнологія.-2012.- №4 (20).- С. 44-50 (Index Copernicus; CiteFactor; Advanced Sciences Index та ін.).

9. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Леоненко І.І., Єгорова А.В. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом: отримання, властивості // Biotechnologia Acta. – 2015. -Т. 8, № 3. – С. 104-109 (Open Academic Journals Index; Index Copernicus та ін.).

10. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Левицький А.П. Мукоадгезивний гель з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. - №3. – С. 30-40 (Index Copernicus; CiteFactor; Advanced Sciences Index та ін.).

11. **Dekina S.S.**, Romanovska I.I., Ovsepyan A.M., Bodyul M.G., Toptikov V.A. Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white // Biotechnologia Acta – 2015.-V. 8, № 6.- P.41-47. (Open Academic Journals Index; Index Copernicus та ін.).

12. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Пашкин И.И. Имобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // Biotechnologia Acta – 2014. - Т.7, № 3. - С. 69-73. (Open Academic Journals Index; Index Copernicus та ін.).

13. Левицький А.П., Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Томіліна Т.В., Хромагіна Л.М., Кнава О.Е. Лікувально – профілактична дія мукоадгезивних плівок з лізоцимом на слизову оболонку порожнини рота після аплікації ліпополісахариду // Одеський медичний журнал.-2014.- № 4. – С. 9-13. (Ulrich's Periodicals Directory).

14. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Сотнікова О.П. Лізоцимвмісний препарат "штучна сльоза": отримання, властивості // Мікробіологія і біотехнологія. - 2015. -№ 4(32). – С.46-52. (Ulrich's Periodicals Directory; Index Copernicus та ін.).

15. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Псахіс І.Й., Псахіс Б.Й. Дослідження чутливості мікроорганізмів до комбінацій лізоциму з лікарськими речовинами. // Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 68-70 (Index Copernicus; Bielefeld Academic Search Engine та ін.).

16. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Севастьянов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лізоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т.19, № 2. – С. 19-24 (Index Copernicus; Bielefeld Academic Search Engine та ін.).

17. Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Шестеренко Ю.А., Сотнікова О.П., Абрамова А.Б., Осташевський В.Л. Лізоцимвмісний препарат для сльозозамінної терапії: фармакотерапевтична ефективність // Медична та клінічна хімія.- 2018. –Т. 20, № 2. – С. 100-104 (Index Copernicus, Bielefeld Academic Search Engine та ін.).

18. Sevastyanov O., Romanovska I., **Dekina S.** Features of the hydrolysis kinetics of *Micrococcus lysodeikticus* by immobilized lysozyme // Innov Biosyst Bioeng. – 2020. - №1(4) - P. 45–50. (DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service; Bielefeld Academic Search Engine та ін.).

19. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Севастьянов О.В., Мальцев Г.В. Аналіз компонентів таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом // Мікробіологія і біотехнологія. - 2020. -№ 1(48). – С. 32-47 (Index Copernicus; CiteFactor; Advanced Sciences Index та ін.).

20. Романовська І.І., Сотнікова О.П., **Декіна С.С.**, Шестеренко Є.А.. Фізико-хімічні властивості і офтальмонешкідливість очної лікарської мазі з лізоцимом // Медична хімія.- 2012 - Т.14, №3(52).-С.52-55. (Google Scholar).

Праці у інших виданнях:

21. **Декіна С.С.**, Успенський О.Є., Гінжол І.В., Остафійчук М.О., Левицький А.П. Вплив оральних аплікацій лізоцимвмісних гелів на стан слизової оболонки щурів після дії ліпополісахариду // Вісник стоматології. – 2016. – № 3. - С. 13-17.

22. **Декіна С.С.**, Успенский О.Е., Селиванская И.А., Хромагина Л.Н. Профилактическое действие на десну крыс фитогеля «Лизоцим-форте» при индометациновой интоксикации // Вісник стоматології. - 2019. - №2 (107). – С. 14-18.

Патенти:

23. Патент України на корисну модель № 72476. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 8/02 (2006.01), А61К 8/64 (2006.01), А61К 8/65 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 27.08.2012. Бюл. № 16.

24. Патент України на винахід 99899. Композиція інгредієнтів для мукоадгезивних полімерних плівок. МПК А61К 9/38 (2006.01), А61К 9/40

(2006.01), А61К 38/47 (2006.01), А61Р 31/00 / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Левицький А.П., Дем'яненко С.О. Опубл. 10.10.2012. Бюл. № 19.

25. Патент України на корисну модель 102170. Антимікробний мукоадгезивний матеріал. МПК А61К 38/46 (2006.01), А61К 31/194 (2006.01), А61К 31/79 (2006.01) / **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М. Опубл. 26.10.2015. Бюл. № 20.

26. Патент України на корисну модель 136449. Поліфункціональний антидисбіотичний засіб «Лізоцим-Форте». МПК (2019.01) А61К 31/00, А61Р 1/00 / Левицький А.П., Романовська І.І., **Декіна С.С.**, Остафійчук М.О., Бочаров А.В., Фурдичко А.І., Петренко О.А., Борис Г.З. Опубл. 27.08.2019. Бюл. № 16.

Матеріали наукових конференцій, конгресів, симпозіумів та з'їздів:

27. **Декина С.С.** Исследование поведения молекул лизоцима при иммобилизации в растворы полимеров // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (9-13 апреля 2012 г., Москва) - С. 1-2.

28. **Декина С.С.**, Овсепян А.М. Мукоадгезивные полимерные пленки с иммобилизованным лизоцимом. XIV Конференція молодих учених та студентів-хіміків Південного регіону України (25-27 апреля 2012, Одеса). – С. 47.

29. **Декина С.С.**, Чернецкая С.В., Слончак В.С., Овсепян А.М. Исследование иммобилизации лизоцима в криогель поливинилового спирта// Матеріали науково-практичної конференції «Сучасні проблеми фармакології, косметології і ароматології» (20 вересня 2013, Одеса). – С. 16-20.

30. **Декина С.С.**, Овсепян А.М. Изучение стерилизации иммобилизованных белковых препаратов – перспективных лекарственных средств // XX Международная конференция «Ломоносов 2013» (8-13 апреля 2013, Москва). – С. 1-2 .

31. **Декина С.С.**, Овсепян А.М., Чернецкая С.В., Слончак В.С. Выделение и частичная очистка лизоцима из белка куриных яиц // XVI Конференция молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28-30 апреля 2014, Одесса). – С. 48.

32. **Декина С.С.**, Романовская И.И., Овсепян А.М., Левицкий А.П. Лизоцимсодержащие полимерные мукоадгезивные пленки // XI Украинский биохимический конгресс (6-10 октября 2014, Киев). – С. 163.

33. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Романовська І.І. Розробка мукоадгезивного гелю бактеріолітичної дії // Мат. IV Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (16-17 жовтня 2014, Харків). – С. 215-216.

34. **Декіна С.С.**, Овсепян А.М., Бодюл М.Г. Виділення і очищення лізоциму з білка курячого яйця. // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (23-24 квітня 2015, Київ). – С. 22.

35. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Мукоадгезивный гель с иммобилизованными лизоцимом и кверцетином // Мат. XVII Конференции молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины с международным участием (28 апреля – 1 мая 2015, Одесса). – С. 12.

36. Ovsepyan A., **Dekina S.** Sterilization methods for medicinal films with immobilized proteins // International Conference for Young Scientists "Actual Problems of Microbiology and Biotechnology" (1-4 June 2015, Odesa). – P. 8

37. Овсепян А.М., **Декіна С.С.** Вплив полімерів на кінетичні параметри лізоциму // Тези доп. конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016» (26-27 травня 2016, Київ). – С. 36 .

38. Романовская И.И., **Декина С.С.**, Сотникова Е.П. Лизоцимсодержащий препарат для слезозаменительной терапии: получение, физико-химические свойства. // Мат. науково-практичної конф. офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» (19-20 травня 2016, Одеса). - С. 208.

39. Овсепян А.М., **Декина С.С.** Разработка метода выделения высокоочищенного лизоцима из белка куриных яиц // Тез. доп. XVIII Наукової молодіжної конференції «Проблеми та досягнення сучасної хімії» (17-20 травня, Одеса). – 2016. – С. 71.

40. **Декіна С.С.**, Романовська І.І., Овсепян А.М., Сотнікова О.П., Левицький А.П. Мукоадгезивні лікарські форми лізоциму // Мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (13-16 вересня 2016, Харків). – С. 344.

41. **Декина С.С.**, Рогожа Е.А. Разработка и исследование таблетированной формы лизоцима и кверцетина // Мат. XIX наукової молодіжної конференції «Проблеми і досягнення сучасної хімії» (26-28 квітня 2017, Одеса) - С. 33.

42. Shesterenko Y., **Dekina S.**, Romanovska I., Sevastyanyan O. Polymeric materials with hydrolytic activity // International conference on biomaterials and biosensors "4th BIOMATSEN 2019" (Mugla, Turkey, 12-18 May 2019). - P. 128.

Особистий внесок:

- 1) здійснено пошук літературних джерел, проаналізовано і виконано ряд досліджень, участь в написанні монографії (№1);
- 2) виконана частина експериментальних досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, написана і підготовлена статті до публікації. (№ 2-5, 7,8, 11, 15);
- 3) здійснено пошук літератури, підготовлені зразки для проведення досліджень, узагальнені і проаналізовані результати, підготовлена стаття до публікації. (№ 6, 9, 10, 12)
- 4) організація та участь у проведенні експериментів, узагальнення результатів, підготовка до публікації (№ 13, 14, 16-20).
- 5) складання опису та формул патентів, теоретичне обґрунтування запропонованих рішень (№ 21-24),
- 6) розробка методології і проведення досліджень, обґрунтування та узагальнення результатів досліджень, написані тези доповіді (№ 25-42)

АНОТАЦІЯ

Декіна Світлана Сергіївна. Біотехнологія мукоадгезивних лізоцим-полімерних систем медичного призначення. - На правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія. - Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, 2020. Дисертаційна робота виконана в Фізико-хімічному інституті ім. А.В. Богатського НАН України.

Дисертація присвячена розробці та застосуванню біотехнологічних підходів до іммобілізації лізоциму в полімери синтетичного і природного походження, з метою створення нових мукоадгезивних систем антибактеріальної дії.

Удосконалено метод виділення лізоциму з протеїну курячого яйця, що дозволяє отримувати ензим, подібний до комерційного препарату. Вперше отримано QSAR модель, що адекватно описує інгібуючий вплив іонів металів на каталітичну активність ензиму. Показана можливість збільшення активності лізоциму і розширення спектра його антимікробної дії шляхом додавання натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти і протеолітичних ензимів.

Показано, що стабілізація лізоциму полімерами відбувається за рахунок утворення асоціатів і залежить від природи, структури носіїв і мольного/масового співвідношення полімер-ензим.

Розроблені мукоадгезивні полімерні системи з іммобілізованим лізоцимом антибактеріальної дії у вигляді крапель, гелів, кріогеля, плівок і таблеткових сумішей, що сприяють прояву ензимом максимальної гідролітичної активності, стабільності, збереження та розширення антимікробних властивостей, пролонгування дії. Розроблена композиція іммобілізованого лізоциму і кверцетину стала основою для створення лікувально-профілактичного мукоадгезивного таблетованого препарату «Лізоцим-ФОРТЕ» пролонгованої антимікробної, антиоксидантної, імуностимулюючої і капіляротекторної дій, впровадженого на НВА «Одеська біотехнологія».

Оцінка кінетичних параметрів функціонування лізоциму після іммобілізації свідчить про вплив полімерів на каталітичну активність, що проявляється в збільшенні константи Міхаеліса, максимальної швидкості реакції і відношення $K_M/V_{\text{макс}}$, і пояснюється перехідною активацією ензиму.

У всіх випадках іммобілізація в полімерні матриці позитивно позначається на функціонуванні лізоциму: стабілізує молекулу ензиму, сприяючи розширенню рН і термопрофілю активності, тривалому зберіганню, забезпечує спрямовану гідролітичну дію на слизові оболонки за рахунок мукоадгезивних властивостей полімерів. Використання в роботі сучасних аналітичних методів моніторингу ефективності іммобілізації надає важливу інформацію про вплив даного процесу на стабільність і активність ензиму, робить значний внесок в біотехнологію іммобілізації лізоциму.

Ключові слова: біотехнологія, лізоцим, мукоадгезивні лікарські форми, іммобілізація, полімери.

АННОТАЦИЯ

Декина Светлана Сергеевна. Биотехнология мукоадгезивных лизоцим-полимерных систем медицинского назначения. – На правах рукописи.

Диссертационная работа на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. - Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, 2020. Диссертационная работа выполнена в Физико-химическом институте им. А.В. Богатского НАН Украины.

Диссертация посвящена разработке и применению биотехнологических подходов к иммобилизации лизоцима в полимеры синтетического и природного происхождения, с целью создания новых мукоадгезивных систем антибактериального действия.

Усовершенствован метод выделения лизоцима из протеина куриного яйца, позволяющий получать фермент, сравнимый с коммерческим препаратом. Впервые получена QSAR модель, адекватно описывающая ингибирующее влияние ионов металлов на каталитическую активность фермента. Показана возможность увеличения активности лизоцима и расширение спектра его антимикробного действия путем добавления динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и протеолитических ферментов.

Показано, что стабилизация лизоцима полимерами происходит за счет образования ассоциатов и зависит от природы, структуры полимерных носителей и мольного/массового соотношения фермент/полимер.

Разработаны мукоадгезивные полимерные системы с иммобилизованным лизоцимом антибактериального действия в виде капель, гелей, криогеля, пленок и таблеточных смесей, способствующие проявлению ферментом максимальной гидролитической активности, стабильности, сохранению и расширению антимикробных свойств, пролонгированности действия. Разработанная композиция иммобилизованного лизоцима и кварцетина легла в основу создания лечебно-профилактического таблетированного препарата антидисбиотического действия «Лизоцим-ФОРТЕ», обладающего пролонгированным антимикробным, антиоксидантным, иммуностимулирующим и капилляропротекторным эффектами, внедренного на НВА «Одесская биотехнология».

Оценка кинетических параметров функционирования лизоцима после иммобилизации свидетельствуют о влиянии полимеров на каталитическую активность и проявляется в увеличении константы Михаэлиса, максимальной скорости реакции и отношения $K_M/V_{\text{макс}}$, что объясняется переходной активацией фермента.

Во всех случаях иммобилизация в подобранные полимерные матрицы положительно сказывается на функционировании лизоцима: стабилизирует молекулу фермента, способствуя расширению рН- и термопрофиля активности, длительному хранению, обеспечивает направленное гидролитическое действие на слизистые оболочки за счет мукоадгезивных свойств полимеров. Использование в работе современных аналитических методов мониторинга эффективности иммобилизации предоставляет важную информацию о влиянии данного процесса на стабильность и активность энзима, вносит значимый вклад в биотехнологию иммобилизации лизоцима.

Ключевые слова: биотехнология, лизоцим, мукоадгезивные лекарственные формы, иммобилизация, полимеры.

SUMMARY

Dekina Svetlana Sergeevna. Biotechnology of mucoadhesive lysozyme-polymeric systems for medical purpose. - *The manuscript.*

The thesis for the degree of doctor of biological sciences, specialty 03.00.20 – biotechnology. - A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute NAS of Ukraine. - National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

The thesis is devoted to the development and application of biotechnological approaches for the immobilization of lysozyme into polymers of synthetic and natural origin, with the aim of creating new mucoadhesive systems of antibacterial action.

The method for lysozyme isolation from chicken egg white has been improved, which makes it possible to obtain an enzyme with a yield of 3.2%, a purity of 95–98%, and an activity of 22025 ± 1500 u / mg, comparable to the commercial lysozyme from AppliChem. The effect of metal ions inhibiting the catalytic activity of lysozyme was established. Using entropy and enthalpy, as well as ionized electronegativity as descriptors, a QSAR model was for the first time obtained, that adequately describes the effect of metal ions on enzyme activity. Approaches have been developed to increase the hydrolytic activity of free and immobilized lysozyme and to expand the spectrum of its antimicrobial action by adding the disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid and proteolytic enzymes.

The interactions of lysozyme with polymers were studied by the methods of viscometry, MALDI mass spectrometry, UV spectroscopy, luminescence, etc. It was revealed that immobilization processes induce molecular mechanisms for the disaggregation of lysozyme associates by complexation. It was shown that stabilization of the enzyme with polymer solutions occurs due to the formation of associates and depends on the nature, structure and concentration of polymer carriers.

Mucoadhesive polymeric systems with immobilized antibacterial lysozyme in the form of solutions, gels, hydrogel coatings and tablet mixtures have been developed, which contribute to the manifestation by the enzyme of maximum

hydrolytic activity, stability, preservation and expansion of antimicrobial properties, prolonged action.

A lysozyme preparation for tear replacement therapy “artificial tear” was obtained with preservation of hydrolytic activity of 95.5% for 1 year. The stabilization of the enzyme is achieved by the formation of ionic bonds between the hydroxyl groups of dextran and the amino groups of lysozyme, and mucoadhesive properties are provided by the addition of hydroxypropyl methylcellulose. “Artificial tear” has values of viscosity, density and osmolality that are close to tear fluid, which meets requirements for eye drops. The study of ophthalmic harmlessness, as well as the pharmacotherapeutic effectiveness of drops on a model of traumatic keratitis, showed the absence of an allergenic effect and effective anti-inflammatory and regenerative effect.

Using the sodium salt of carboxymethyl cellulose as a matrix, immobilization of lysozyme and lysozyme with quercetin was carried out by gel incorporation. The gel with lysozyme has high adhesive properties to mucous membrane (6000 Pa), prolonged action, the enzyme is active in a wide range of pH values, stable in an acidic media and during prolonged storage (0-4 ° C). The developed gel is a preparation with complex biological activity and is promising for further biomedical research.

A method for cryoimmobilization of lysozyme into polyvinyl alcohol is proposed. Coatings with quantitative preservation of protein and high hydrolytic activity of the enzyme are obtained, which have an expanded pH profile of activity, stability in an acidic environment, and retain 95% activity (3 months). The immobilized lysozyme exhibits a pronounced antimicrobial effect against the test strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and has anti-inflammatory and antidysbiotic effects in the inflammation of the mucous membranes of the oral cavity induced by lipopolysaccharide.

By immobilization of lysozyme in a complex matrix based on gelatin and sodium salt of carboxymethyl cellulose, mucoadhesive filmic forms of directed prolonged action, long shelf life (3 years) were obtained. The lysozyme included in the polymer matrix is stable after immobilization and sterilization by γ -radiation (28 kGy). The obtained films are effective in the treatment of experimental stomatitis in rats: a decrease in inflammation and markers of microbial contamination of the mucous membranes by 80.9% and 97.5%, respectively.

Thanks to theoretical, technological and analytical studies, the developed composition of immobilized lysozyme and quercetin formed the basis for the development of the therapeutic and prophylactic tablet preparation of the antidysbiotic effect "Lysozyme-FORTE", which has a prolonged antimicrobial, antioxidant, immunostimulating and capillary-protective effects.

An assessment of the kinetic parameters of lysozyme functioning after immobilization testifies to the effect of polymers on catalytic activity, which manifests itself in an increase in the Michaelis constant, maximum reaction rate, and K_M / V_{max} ratio, which is explained by transitional activation of the enzyme.

In all cases, immobilization in polymer matrices positively affects the functioning of lysozyme: it stabilizes the enzyme molecule, contributing to the expansion of pH and thermal profile of activity, long-term storage, provides directed hydrolytic effect on mucous membranes due to mucoadhesive properties of polymers. The usage of modern analytical methods for monitoring the effectiveness of immobilization in work provides important information on the effect of this process on the stability and activity of the enzyme, and makes a significant contribution in the biotechnology of immobilization of lysozyme.

Key words: biotechnology, lysozyme, mucoadhesive dosage forms, immobilization, polymers

Підп. до друку 5.08.2020. Формат 60x84/16. Папір офсет.
Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 2,33.
Тираж 100 пр. Зам. № И20-08-82

Національний університет «Одеська морська академія»
65029, м. Одеса, Дідріхсона, 8.
Тел./факс (0482) 34-14-12
publish-r@onma.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 1292 від 20.03.2003